

Contribution à l'étude des propriétés bactériolytiques du sérum au cours de la vaccination contre les salmonelloses

Travail de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
(Chef de Laboratoire : Médecin-L'-Colonel L. COLOBERT)

THÈSE

présentée

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
et soutenue publiquement le 11 Octobre 1963
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

CIRODDE Michel

né le 9 Mai 1936 à PARIS (XV^e)





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553206_0055

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE : Membre de l'Institut.
M. H. HERMANN : Correspondant de l'Institut.

Doyen : M. J.-F. CIER.

Assesseurs : MM. M. LEVRAT.
L. REVOL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEFINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN,
GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET

PROFESSEURS

Clinique urologique MM. CIBERT
Physique biologique (dét. à Beyrouth) PONTIUS
Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale DECHAUME
Chimie organique et toxicologie CHAMBON
Clinique chirurgicale B. WERTHEIMER
Clinique médicale B. PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires FROMENT
Clinique médicale C. CROIZAT
Chimie biologique et médicale ENSELME
Clinique chirurgicale A. MALLET-GUY
Pharmacie galénique REVOL
Clinique gynécologique POLLOSSON
Clinique obstétricale PIGEAUD
Médecine du Travail BOURRET
Clinique médicale A. LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale SOHIER
Botanique et cryptogamie NETIEN
Clinique chirurgicale C. BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie DREYON
Médecine légale et déontologie ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie MOUINIER-KUHN
Clinique ophtalmologique PAUFIQUE
Cliniq. de dermat., syphilig., et allerg. THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie BRUN
Clinique traumatologique des membres CREYSSEL

Clinique carcinologique DARGENT
Anatomie pathologique GUICHARD
Pathologie générale et expérimentale GIRARD Paul
Anatomie LATARIET
Pathologie chirurgicale PEYCELON
Thérapeutique GIRARD Marcel
Pathologie médicale VACHON
Physio-pathologie des voies respirat. GALY
Radiologie PAPILLON
Clinique des maladies infectieuses JEUNE
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale GONIN
Bactériologie MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales BANSSILLON
Physiologie B. CHATONNET
Clinique endocrinologique GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique TRILLAT
Clinique stomatologique FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique DORCHE
Histologie et embryologie DUMONT Louis
Chimie PERROT
Physiologie A. CIER J.-F.
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire PERRIN J.
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge X.....
Biologie médicale et pharmacodynamie X.....

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine MM. BERGER
Bactériologie BERTOYE
Neuro-chirurgie MANSUY
Chimie pharmaceutique COLLET
Clinique de pédiatrie SARROUY

Climatologie LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique LIARAS
Neuro-chirurgie LEQUIRE
Médecine générale REVOL
Thérapeutique chirurgicale GOINARD

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie MM. ROMAN
Pharmacie chimique et pharmacologie CIER André

Anatomie pathologique FEROLDI
Physique biologique MORET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

Chimie biologique MM. CREYSSEL Roger
Hygiène THIVOLET
Parasitologie GARIN
Electro-radiologie PINET
Botanique et cryptogamie ODDOUX
Chimie analytique De SOLLIERS
Médecine du travail TOLOT
Médecine générale DESPIERRES
Neuro-psychiatrie GUYOTAT
Chirurgie générale DESCOTES

Pathologie expérimentale JOUVET
Physique biologique PEYRIN
Anatomie pathologique TOMMASI
Electro-radiologie BUFFARD
Médecine générale et thérapeutique LEJEUNE
Stomatologie De MOURGUES F.
Maladies infectieuses NAUSSAC
Chirurgie générale REBOUILLAT
Pédiatrie ROMAGNY

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

Anatomie MM. DUROUX
Thérapeutique BRETTE
Anatomie BOUCHET
Hématologie FAYRE-GILLY
Histologie et embryologie GIROD
Chimie biologique GRAS

Chimie analytique MALLEIN
Hygiène RIFFAT
Biologie médicale et pharmacodynamie FAUCON
Physiologie FLANDROIS
Bactériologie VIALIER-RAYNARD

AGREGES EN EXERCICE

Obstétrique MM. BURTHIAULT
Pédiatrie et puériculture FRANÇOIS
Oto-rhino-laryngologie GIGNOUX
Chirurgie générale GUILLEMIN
Chirurgie générale JAUBERT DE BEAUJEU
Chirurgie générale MARION Pierre
Chirurgie générale MICHAUD
Médecine générale PLAUCHU
Médecine générale PONT
Chirurgie générale SAUTOT
Médecine générale TRAEGER
Médecine générale VIGNON
Ophtalmologie BONAMOUR
Médecine légale COLIN
Dermatologie COLOMB
Chirurgie générale De MOURGUES G.
Médecine générale DEVIC
Obstétrique DUMONT Martial
Urologie DURAND
Chirurgie générale FRANCHILLON
Chirurgie générale SAUBIER

Neuro-psychiatrie SCHOTT
Neuro-chirurgie ALLEGRE
Electro-radiologie CHASSARD
Orthopédie FAYSSÉ
Oto-rhino-laryngologie GAILLARD
Médecine générale GARDE
Ophtalmologie HUGONNIER
Pneumo-phthisiologie KALB
Médecine générale LARBRE
Chirurgie générale MARET
Médecine générale MORNEX
Médecine générale NORMAND
Médecine générale PERRIN André
Pédiatrie et puériculture BETHENOD
Stomatologie DUMAS
Médecine générale FRIES
Obstétrique GARMIER
Médecine générale LAMBERT
Chirurgie générale MICHOULIER
Médecine générale NOEL
Médecine générale ROBERT
Orthopédie SCHNEPP

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Professeur R. SOHIER Président - Professeurs P. MONNET, J. THIVOLLET et G. RIFFAT, Assesseurs

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ANNÉE 1963 - N° 180

Contribution à l'étude des propriétés bactériolytiques du sérum au cours de la vaccination contre les salmonelloses

Travail de la Division de Microbiologie
du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
(Chef de Laboratoire : Médecin-L'-Colonel L. COLOBERT)

THÈSE

présentée

à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon

et soutenue publiquement le 11 Octobre 1963

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

CIRODDE Michel

né le 9 Mai 1936 à PARIS (XV^e)





A MES GRANDS-PÈRES

Affectueusement

A MES PARENTS

*Faible témoignage de ma reconnaissance
et de ma profonde affection.*

A MA FEMME

En gage de mon Amour.

A MA FILLE ISABELLE

A MES BEAUX-PARENTS

Hommage affectueux.

A MES ONCLES A MES TANTES¹

A MES BEAUX-FRÈRES

A MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

A TOUS MES CAMARADES A.E.T.

A NOTRE MAITRE

MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL L. COLOBERT

Breveté Technique

*Maître de Recherches des Services de Santé des Armées.
Chef de la division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé
des Armées.*

Il a été l'instigateur de ce travail qu'il a conçu et dont il a suivi pas à pas la progression. Pendant notre séjour dans son laboratoire, il n'a pas cessé de prodiguer ses conseils et son aide, ne ménageant ni son temps ni sa peine.

Qu'il veuille bien recevoir l'expression de notre reconnaissance et de notre admiration.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SOHIER

Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

Membre correspondant de l'Académie de Médecine

Expert de l'O.M.S.

Officier de la Légion d'Honneur

A la Faculté, nous avons pu apprécier la richesse et la clarté de son enseignement. Nous lui sommes reconnaissant d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail au cours de son élaboration. Il nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici le témoignage de notre déférente gratitude et de notre profond respect.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MONNET

*Professeur de Bactériologie
Médecin des Hôpitaux*

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. THIVOLLET

*Maître de Conférences, Agrégé d'Hygiène
Médecin des Hôpitaux*

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ G. RIFFAT

Nous les remercions de l'honneur qu'ils nous
font en acceptant de nous juger.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-GÉNÉRAL R. BORON

*Professeur agrégé du Val-de-Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction des Genettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL A. CAMELIN

*Professeur Agrégé du Val-de-Grâce
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
Médecin-chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction des Genettes.*

A NOS MAÎTRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON
DES HOPITAUX CIVILS
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION
DES GENETTES

en particulier à

MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL BOURREL
MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL COUTURE
MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL PAPET
MONSIEUR LE MÉDECIN COMMANDANT ROUMAGOUX
MONSIEUR LE MÉDECIN COMMANDANT QUINARD
MESSIEURS LES CAPITAINES BECK - BLANC -
BOCQUET - JOLY - PIROLLET

AU PERSONNEL DE LA DIVISION DE MICROBIOLOGIE DU
CENTRE DE RECHERCHES DU SERVICE DE SANTÉ
DES ARMÉES

A MES CAMARADES DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE
SANTÉ MILITAIRE

INTRODUCTION

Dans le cadre des recherches entreprises depuis 1956 à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées sur le mécanisme de l'autarcèse, Colobert et Kirn ont individualisé en 1962 un système antibactérien du sérum des sujets normaux, actif sur certaines bactéries à Gram négatif, qu'ils ont désigné sous le nom provisoire d'*obsistine*. Le fait que la vaccination par le vaccin antityphoparatyphoïdique développait ce système, et un certain nombre d'autres caractères les ont amenés à admettre que l'*obsistine* jouait un rôle important dans le mécanisme de l'immunité bactérienne, qu'elle soit naturelle ou acquise. Des travaux plus récents, non encore publiés, ont permis de constater que l'*obsistine* est en réalité un système complexe formé d'au moins quatre facteurs de nature protéinique, individuellement inactifs mais dont le mélange restaure une forte activité lytique sur les salmonelles. Il est facile par précipitation par les phosphates de séparer deux fractions, chacune d'elles contenant deux des facteurs lytiques.

L'effet de l'injection de vaccin TAB sur la teneur en *obsistine* du sérum avait été jusqu'ici suivi chez le singe. Le médecin-lieutenant-colonel Colobert nous a demandé de voir ce qu'il en était chez l'homme au cours et à la suite de la vaccination. Après avoir fait le point, dans ce mémoire, des connaissances actuellement acquises sur le contrôle de l'efficacité de la vaccination TAB et sur les facteurs antimicrobiens des tissus et des humeurs pouvant jouer un rôle dans l'immunité antibactérienne, nous exposerons dans une seconde partie les résultats de notre enquête poursuivie sur les jeunes élèves à l'Ecole du Service de Santé Militaire.

PREMIÈRE PARTIE

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

CONTROLE DE L'EFFICACITÉ DE LA VACCINATION TAB

Apprécier l'efficacité d'un vaccin antimicrobien implique une connaissance suffisante des facteurs qui conditionnent la virulence d'une bactérie donnée. Si ce problème a pu être résolu convenablement dans certains cas, par exemple dans celui de la coqueluche Cockburn, (22), il n'en est pas de même dans le cas des affections typhoparatyphoidiques. En ce qui concerne ces dernières, la valeur des épreuves de laboratoire utilisables aujourd'hui est incertaine, d'autant qu'elles ne conduisent pas toujours à des résultats parallèles. La seule épreuve de valeur indiscutable demeure le contrôle *a posteriori*, par l'observation statistique, de la protection obtenue vis-à-vis de l'infection naturelle chez les populations vaccinées, mais c'est ce que les épreuves de laboratoire cherchent à remplacer et à éviter.

Actuellement, nous disposons pour étudier l'efficacité d'une vaccination, d'une part d'épreuves *in vitro*, d'autre part d'épreuves *in vivo*.

I. — ÉPREUVES *IN VITRO*.

Les épreuves *in vitro* cherchent à mettre en évidence les anticorps qui se développent du fait de la vaccination vis-à-vis des bactéries ou des constituants antigéniques provenant de leur paroi. Elles font appel aux phénomènes d'agglutination, de précipitation, de déviation du complément ou encore à celui de l'hémagglutination si l'on absorbe l'antigène O ou Vi à la surface d'hématies (31, 55, 58). Leur spécificité est donc en relation avec la structure antigénique des bacilles typhoïdiques et paratyphoïdiques.

a) Recherche des agglutinines spécifiques.

La recherche et le dosage des anticorps agglutinants constituent-ils un critère d'immunité dans la vaccination TAB ? On a certes observé que celle-ci provoque, tant chez l'homme que chez les animaux, l'apparition d'anticorps divers, en même temps qu'une immunité acquise se développe vis-à-vis d'une infection ultérieure, naturelle ou expérimentale, mais si la corrélation est certaine, il semble bien que le second phénomène ne soit pas lié au premier par une relation directe de cause à effet. La présence des agglutinines, recherchées par ailleurs en clinique pour poser le diagnostic d'une infection, témoigne de la réponse de l'organisme à l'introduction de corps microbiens, mais n'implique pas nécessairement la présence de facteurs protecteurs. On connaît le cas d'anciens malades qui perdent les agglutinines circulantes de leur sérum quelques mois après la fin de la maladie et qui néanmoins restent immunisés contre une infection ultérieure à *Salmonella* (Chalier et Ledru (20). Par contre, le cas d'infection de personnes vaccinées contre les salmonelles et conservant des agglutinines circulantes dans leur sérum, est également connu (44).

A défaut d'autre chose, on étudia le développement des agglutinines au cours de la vaccination. On avait remarqué que le sérum des sujets atteints de fièvre typhoïde présentait un titre élevé d'agglutinines O (1), alors que celui des vaccinés présentait un haut taux d'agglutinines H (2). Fricker et Ferrabouc (40), Liger (57), faisant une étude comparée sur la production d'anticorps agglutinants chez des sujets ayant reçu uniquement du vaccin TAB, et d'autres ayant reçu le vaccin associé DT.TAB, avaient constaté une légère supériorité des vaccinations associées sur les vaccinations simples en ce qui concernait la production d'agglutinines. Ciuca (21) fit remarquer qu'il ne fallait pas attendre de la recherche des anticorps chez les

anciens vaccinés une confirmation de l'immunité. En effet, les agglutinines disparaîtraient du sérum six à douze mois après la vaccination. D'ailleurs à la suite d'une fièvre typhoïde qui cependant assure une immunité apparemment définitive, il est rare de trouver des anticorps circulants deux ans après la maladie ou parfois plus tôt. Agglutinines circulantes et immunité ne seraient pas directement liées pour de nombreux auteurs dont Vincent (88), Bonnefoi (12), Perry (70), Siler (78).

La découverte de l'antigène Vi par Félix et Pitt (37) avait suscité l'espoir de trouver dans les anticorps correspondants le support de l'immunité acquise. En fait, Félix et ses collaborateurs avaient voulu ramener tout le problème de l'immunité antityphoïdique aux seules agglutinines Vi. Pour Félix, un vaccin antityphoïdique efficace était celui qui produisait chez le lapin ou la souris l'apparition d'agglutinines Vi, tandis que tout vaccin ne faisant pas apparaître ces anticorps chez les animaux d'expérience était à rejeter. Il semble bien qu'il n'en soit rien et dans un rapport récent consacré à l'étude comparée, à l'aide des épreuves de laboratoire, des vaccins utilisés dans la campagne de vaccination yougoslave de 1954-1955 (94), Edsall et ses collaborateurs (35) concluent qu'au sujet de l'antigène Vi, les résultats obtenus dans trois laboratoires différents aussi bien que ceux obtenus sur les volontaires étudiés dans les essais expérimentaux d'Osijek (94), ne permettent pas de retenir l'idée que cet antigène soit d'une grande importance dans la protection contre la fièvre typhoïde. Il apparaît même que le vaccin qui avait le titre en antigène Vi le plus élevé, est celui qui a procuré chez l'homme la protection la moins efficace contre la fièvre typhoïde. Standfast (83) a attiré l'attention sur le fait qu'il est possible de protéger des souris contre des souches de *Salmonella typhi* riche en antigène Vi, au moyen de la souche T 5501 dépourvue de cet antigène. Ces faits confirment donc bien l'idée que l'antigène Vi ne serait pas le facteur essentiel du vaccin antityphoïdique.

Dans leur rapport de 1962 (95), les experts de la Commission Yougoslave soulignèrent que les épreuves sérologiques n'ont montré aucune relation entre le pouvoir protecteur effectif des vaccins expérimentés et leur teneur en antigènes Vi, H et O, pas plus qu'avec la teneur du sérum en opsonines, évaluée par l'épreuve d'opsonophagocytose.

Il est vraisemblable que la production d'anticorps circulants ne représente qu'un des nombreux mécanismes de l'immunité. Il ne faut donc pas ramener l'immunité uniquement aux anticorps décelés dans le sérum. Il n'est pas prouvé que les réactions d'agglutination et de précipitation qui sont utilisées couramment dans les épreuves *in vitro* aient un rôle quelconque dans le mécanisme de la résistance immunologique à l'infection, ni même que ces réactions se produisent *in vivo*. Un parallélisme entre les titres d'agglutination et le pouvoir protecteur conféré par un vaccin ne peut être que fortuit.

II. — ÉPREUVES *IN VIVO*.

Les épreuves *in vivo* sont au nombre de deux, celle de séroprotection sur la souris et celle de séroprotection sur embryon de poulet.

a) *L'épreuve de séroprotection sur la souris.* — On a espéré que l'épreuve de séroprotection passive sur la souris vis-à-vis d'une inoculation expérimentale permettrait enfin de déterminer la valeur de l'immunité acquise après une vaccination antibactérienne (11).

Le principe de cette épreuve est le suivant : un lot de souris reçoit par voie intrapéritonéale 0,5 ml du sérum à éprouver ; une demi-heure plus tard, les souris reçoivent, de même qu'un lot de témoins, plusieurs doses minimales mortelles de l'émulsion microbienne. Alors que les témoins meurent, on doit observer une survie des souris qui ont reçu le sérum si ce dernier protège, c'est-à-dire si l'individu est immunisé.

Il n'existe pas de parallélisme entre le taux de l'agglutination et le niveau de séroprotection, ce dernier persistant plus longtemps que le premier aussi bien chez les vaccinés que chez les anciens malades ainsi que l'ont montré Bonnefoi (12) et Jude (51). Cependant cette épreuve n'est pas à l'abri des critiques. En effet, si selon certains auteurs dont Dumas (33), cette épreuve reflète la virulence relative des souches de bacilles typhoïdiques pour l'homme et si Perry, Findlal et Bensted (69) ont constaté que la souris est l'animal de laboratoire le plus indiqué pour la recherche des caractères d'immunogénité et de virulence de souches de *Salmonella typhi*, il est certain que cet animal présente au moins deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, on sait que le bacille d'Eberth n'est pas un agent naturellement pathogène pour la souris qui est peu sensible à l'action létale du germe et de ses produits. Enfin, le fait que la souris peut être un

porteur d'autres salmonelles, dont *Salmonella typhi-murium*, conduit parfois à des résultats erronés. C'est pourquoi on a tenté de sélectionner les lignées de souris afin d'obtenir des résultats plus homogènes (Nicolesco (65). Jusqu'en 1947, on utilisait l'injection intrapéritonéale pour inoculer les antigènes vaccinaux. Or, Landy et ses collaborateurs (54) ont montré que l'inoculation intracérébrale chez la souris permettait une appréciation plus exacte de la valeur de l'immunité.

Si l'on utilise l'inoculation par voie intrapéritonéale, on est obligé d'injecter des quantités importantes de salmonelles pour obtenir une infection artificielle. Mais, dans ces conditions, la mort de l'animal peut être due aussi bien au pouvoir toxique des corps microbiens qu'au pouvoir infectant du bacille injecté (Jude et Masse (51). Pour palier à cet inconvénient, on peut utiliser un artifice qui consiste à mettre en suspension la préparation virulente à injecter, dans une suspension de mucine. Cela permet, comme l'ont montré Nungester, Wolf et Jourdonnais (66) d'une part et Miller (61) d'autre part, d'obtenir des doses minima mortelles correspondant à de très petites quantités de bacilles. Mais pour Orskov (68), on crée ainsi des conditions d'expérimentation tout à fait artificielles. Quel que soit le protocole expérimental utilisé, l'épreuve de séroprotection sur la souris, appliquée à l'étude de l'immunité antityphoïdique a permis de faire des constatations très intéressantes. Ainsi la vaccination TAB provoquerait l'apparition de facteurs protecteurs dans le sérum. Les sérums qui les contiennent confèreraient à la souris une immunité passive, lui permettant de résister à l'inoculation d'un nombre variable de doses minimales mortelles, d'une souche virulente de *Salmonella typhi*. Cette épreuve fut utilisée primitivement aux Etats-Unis par Rake (74); en France, Boivin et Richou, (9) (10), Bonnefoi et Mme Grabar (12), Durand (34), Brisou et Brangier (16) l'ont appliquée, soit à l'étude de l'immunité consécutive aux injections de TAB, soit au contrôle de l'efficacité des préparations vaccinales, soit au cours des infections typhoparatyphoïdiques, et lui accordent un certain crédit. Cependant, Standfast (82), au cours d'une étude comparative sur la valeur respective de différents vaccins TAB, a noté que l'épreuve de séroprotection sur la souris n'a pas donné de résultats satisfaisants. Cet auteur s'est demandé si la protection de l'homme ne dépendrait pas d'autres facteurs que de ceux titrés par cette épreuve. Selon Edsall, Carlson, Formal et Benenson (35), on peut en variant les protocoles expérimentaux obtenir des épreuves

sur la souris n'importe quels résultats. Raska, Matejovska et Jelinek (75) pensent que les techniques actuellement utilisées ne sont pas satisfaisantes surtout en ce qui concerne l'étude de l'infection provoquée chez la souris par injection intrapéritonéale. Ces auteurs estiment qu'il serait intéressant de rechercher la bactériémie chez les animaux en expérience après l'injection de la dose d'épreuve. Cette façon de procéder permettrait de suivre avec plus d'exactitude l'évolution de l'infection provoquée et la valeur de la protection conférée par le vaccin.

b) *L'épreuve de séro-protection sur embryon de poulet.*

En 1941, Weill et Gall (91) découvrirent que l'embryon de poulet était très sensible aux *Salmonelles* pathogènes pour l'homme. La DL 50 était parfois de l'ordre de l'unité pour les souches les plus virulentes ; elle demeurait relativement stable pour une même souche de bacilles. A la suite de ces constatations, M^{mes} Grabar et Le Minor (43) mirent au point une épreuve de séro-protection sur embryon de poulet. Le principe de cette épreuve est le suivant : on détermine pour la souche de salmonelles utilisée la dose minimale qui tue 50 pour 100 des embryons de poulet en trois jours. Comparativement, on injecte un mélange d'une quantité fixe de sérum à étudier et d'un nombre variable de bactéries. On détermine le nombre minimum nécessaire pour obtenir la mort de 50 pour 100 des embryons en trois jours. Le pouvoir protecteur du sérum se traduit par l'augmentation de celui-ci par rapport aux témoins. La technique expérimentale est la suivante : on utilise des œufs de poule de la race Rhode-Island ; ces œufs sont fécondés depuis dix ou onze jours et conservés dans un incubateur ; le sérum à éprouver, dilué au 1/10 dans une solution de chlorure de sodium à 9 pour 1 000, est mélangé à un volume égal de suspension microbienne renfermant de 20 à 20 000 germes par millilitre. La bactérie d'épreuve est soit une souche de *Salmonella typhi* (44, 45), soit une souche de *Salmonella para typhi A* également pathogène pour l'embryon de poulet (46). On inocule sur la membrane chorio-allantoïde de l'œuf 0,2 ml du mélange à volume égal (sérum dilué au 1/10 et suspension titrée). Les lots témoins reçoivent uniquement des suspensions de germes en l'absence de sérum de manière à évaluer la virulence de la souche utilisée. Les œufs inoculés sont replacés à l'incubateur et on dénombre dans chaque lot, trois jours plus tard, les embryons morts et les embryons vivants. On apprécie la DL 50 par la méthode de Reed

et Muench. Il semble que l'épreuve de séro-protection sur embryon de poulet constitue une véritable épreuve de virulence et non de toxicité comme c'est le cas lorsqu'on utilise la souris. Il est difficile de se faire une opinion précise sur la valeur de cette épreuve qui n'a été encore que peu utilisée. On peut avoir des résultats tout à fait différents dans l'évaluation des pouvoirs protecteurs d'un sérum humain, suivant que l'on emploie la méthode sur souris et la méthode sur embryon de poulet. Nous devons donc être très prudents dans l'interprétation des résultats expérimentaux obtenus chez les animaux lorsque nous apprécions la valeur immunisante d'un vaccin microbien destiné à l'homme.

III. — ÉPREUVE ÉPIDÉMIOLOGIQUE.

Les études portant sur l'immunisation active de groupes de population étendus doivent, pour donner des résultats valables, satisfaire à certaines conditions. Celles-ci sont exposées dans le rapport publié par Cockburn en 1955, dans le *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé* (22). Cet auteur définit ainsi les principes fondamentaux de l'épreuve épidémiologique : « Les groupes vaccinés et les groupes témoins doivent au départ être « semblables » sur les points essentiels pouvant influencer les résultats. Les volontaires — tous indemnes de la maladie sur laquelle porte l'étude, n'en ayant pas été atteints antérieurement et n'ayant pas été traités par la substance soumise à l'essai — seront répartis au hasard en deux groupes. Afin d'entretenir l'intérêt pour l'étude à laquelle ils participent, tous les sujets recevront une injection, mais ignoreront s'ils font partie du groupe « traité » ou du groupe « témoin ». Les uns recevront la substance soumise à l'essai, les autres, une substance thérapeutique inactive, qui donnera, dans la mesure du possible, une réaction locale analogue. » C'est à cette épreuve que l'Organisation Mondiale de la Santé (94) a eu recours en 1954-1955 dans l'étude effectuée sur l'efficacité des préparations vaccinales TAB, dans la ville et le district d'Osijek en Yougoslavie.

Jusqu'en 1954, la valeur protectrice, pour l'homme, des vaccins antityphoparatyphoïdiques n'avait jamais été contrôlée de manière rigoureuse. Après la seconde guerre mondiale, le gouvernement yougoslave, devant les épidémies de fièvre typhoïde qui sévissaient sur son territoire, demanda l'intervention de l'O.M.S. Les enquêteurs firent appel à trois vaccins. Le premier était un vaccin TAB tué par

la chaleur et conservé dans le phénol ; le second était un vaccin TAB à l'alcool ; le troisième était un vaccin antidysentérique et servait de témoin. Les ampoules des trois vaccins étaient codées si bien que les vaccinateurs ignoraient lequel des trois ils injectaient. Ceci avait pour but de supprimer les facteurs psychologiques susceptibles de fausser l'expérimentation. Plus de 35.000 personnes se prêtèrent volontairement aux épreuves, leur âge s'échelonnait entre 5 et 50 ans. Les vaccinations débutèrent en avril 1954 à raison de deux injections vaccinales administrées à trois semaines d'intervalle. Le nombre de sujets ayant reçu ces deux injections correspondait à 33 p. 100 de la population totale. L'année suivante certains d'entre eux reçurent une dose de rappel. Lors de l'épidémie de fièvre typhoïde qui commença peu après la fin de la campagne de vaccination et se poursuivit jusqu'au mois de décembre 1954, 47 cas de fièvre typhoïde furent diagnostiqués cliniquement et confirmés bactériologiquement parmi les vaccinés. Ils se décomposaient ainsi : 23 cas étaient apparus dans le groupe témoin ayant reçu du vaccin antidysentérique, 17 cas dans le groupe qui avait reçu le vaccin à l'alcool et 7 cas dans le groupe qui avait reçu le vaccin phénolé. L'année suivante des résultats identiques furent observés chez les sujets ayant reçu une injection de rappel. Ceci montra que le vaccin phénolé conférait une protection supérieure à celle du vaccin à l'alcool. Cette différence s'est surtout manifestée dans le groupe des personnes âgées de 5 à 14 ans. Le lot des vaccins phénolés utilisés au cours de cette étude a protégé environ 70 p. 100 des vaccinés ; ce vaccin a également l'avantage de pouvoir être employé sur le terrain sans être conservé à 4° C comme le vaccin à l'alcool. Dans les années qui suivirent, Edsall, Carlson, Formal et Benenson (35) procédèrent à une étude comparative de la valeur immunogène des différents vaccins expérimentés en Yougoslavie. Ils suivirent d'une part, la réponse sérologique de lapins ayant reçu les divers types de vaccin, d'autre part l'immunisation passive de la souris par du sérum de lapin immunisé au moyen de l'un des vaccins à l'étude.

Ces diverses épreuves donnèrent des résultats discordants ; si bien que les auteurs mirent en doute la valeur réelle des épreuves sur la souris — telles qu'elles furent pratiquées — pour préciser la valeur d'un vaccin et prédire son activité chez l'homme. En outre, ces auteurs soulignèrent l'importance que pourrait avoir l'antigène H dans l'établissement de l'immunité alors que l'antigène Vi semblait perdre l'importance qu'on lui attribuait en tant que facteur vaccinant.

Standfast (82), au cours d'études identiques, tira les mêmes conclusions et fit remarquer que les épreuves d'agglutination avaient montré que le vaccin alcoolisé et le vaccin phénolé différaient fortement par leur antigénicité H, beaucoup plus élevée dans le vaccin phénolé. En 1962, un dernier rapport publié par les experts de la Commission Yougoslave (95), tenant compte du nombre de typhoïdes survenues sur 56 000 sujets vaccinés, confirma la supériorité du vaccin phénolé par rapport au vaccin à l'alcool. Ce rapport insista également sur le fait que les résultats des essais de laboratoire sur la souris, ne correspondaient pas à ceux que l'on observait chez l'homme.

En 1958, dans le but d'évaluer l'efficacité d'un vaccin anti-typhoïdique, des auteurs russes se sont également adressés à une épreuve épidémiologique. En U.R.S.S., depuis de nombreuses années, on utilise pour la vaccination des adultes un polyvaccin contenant des antigènes complets de *Salmonella typhi abdominalis*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B*, *Shigella Flexneri*, *Shigella Sonnei*, *Vibrio cholerae* et une anatoxine tétanique purifiée. A la demande du ministre de la Santé, une épreuve pratique de ce vaccin, strictement contrôlée, a été entreprise en 1958 par Khasanov, Kheifets et Salmin (52), sur une population de plus de 90 000 personnes âgées de 16 à 60 ans, dans quatre localités où les fièvres typhoïde et paratyphoïdes étaient encore des causes de morbidité. La moitié environ des personnes participant à l'essai reçurent le vaccin complet (moins l'antigène cholérique), l'autre moitié, un vaccin privé des antigènes bactériens et ne contenant que l'anatoxine purifiée. Pendant les dix mois d'observation, 53 cas de typhoïde et de paratyphoïdes survinrent dans les divers groupes, la fréquence des cas étant significativement inférieure dans les groupes vaccinés par les antigènes typhoïdiques. Les auteurs ont déduit de l'analyse statistique des chiffres de fréquence, qu'une seule injection de polyvaccin contenant les antigènes adsorbés sur phosphate de calcium assure une protection efficace.

En 1961, dans une petite ville de Roumanie où la fièvre typhoïde régnait à l'état endémique, Nestoresco (64) s'est livré à une enquête analogue. Cet auteur a comparé la résistance spécifique conférée par la vaccination TAB et l'immunité des anciens malades de fièvre typhoïde. Il a vacciné les sujets vierges de toute salmonellose et n'ayant jamais reçu de vaccination, à l'aide d'un vaccin TAB chauffé, conte-

nant un milliard cinq cent millions de bactéries par millilitre. Son étude porta sur 101 sujets vaccinés depuis un an ; 122 sujets vaccinés depuis deux ans et ayant reçu une injection de rappel ; 95 sujets vaccinés depuis trois ans et ayant reçu deux injections de rappel et 190 anciens malades. Il remarqua que les sujets vaccinés depuis trois ans et ayant reçu deux injections de rappel étaient les seuls à posséder une immunité se rapprochant de celle des anciens malades de fièvre typhoïde. Dans les autres groupes, il constata l'apparition de cas de fièvre typhoïde ; d'autant plus nombreux que la vaccination était plus récente.

En fait, la seule méthode qui soit vraiment valable pour étudier la valeur immūnogène des vaccins destinés à l'homme, c'est l'observation statistique chez l'homme de la morbidité et de la mortalité dues à la maladie contre laquelle on veut immuniser. Elle permet de comparer la valeur de différents modes de préparation d'un vaccin, de comparer l'effet protecteur de différentes doses, l'importance du nombre des injections, le rythme de ces dernières et le nombre des injections de rappel qui sont nécessaires pour maintenir l'immunité. On a soin de comparer les résultats à un groupe réservé comme témoin auquel on a injecté du « *placebo* »*. Il est évident que les conditions requises pour une telle expérimentation sont difficilement réalisables ; on doit souvent se contenter de l'observation d'épidémies fortuites. En outre, de nombreux auteurs, dont Thibault (84), estiment que si la vaccination atteignait au moins 87 % des individus, l'endémie typhoïdique cesserait. En 1921, Vincent (87) déclarait également : « J'ai la conviction que la vaccination de tous les habitants d'un pays contre les maladies typhoïdes est appelée à faire disparaître pratiquement celles-ci, mais cet idéal n'est pas réalisable, parce que l'application de la vaccination antityphoïdique exige à la fois le concours des médecins et le consentement des populations. »

* Les observations expérimentales dont nous faisons état dans ce travail montrent qu'il importe que le *placebo* soit de manière certaine incapable d'intervenir sur les mécanismes immunitaires même non spécifiques. A ce point de vue, le choix comme *placebo* d'un vaccin antidysentérique, fait par la Commission Yougoslave dans l'expérimentation réalisée en 1954-1955 (94), serait une erreur ; d'autant plus que Cockburn (22), dans un rapport antérieur, recommandait d'utiliser comme *placebo* une substance thérapeutique inactive.

CHAPITRE II

FACTEURS ANTIMICROBIENS DES TISSUS ET DES HUMEURS, ACTIFS SUR LES BACTÉRIES A GRAM NÉGATIF

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, les anticorps qui apparaissent au cours de la vaccination ou à la suite d'une infection ne peuvent être considérés comme le support de l'immunité acquise.

De fait, on constate au laboratoire que les salmonelles se développent de façon luxuriante sur des milieux contenant des anticorps ; en revanche, il est certain que les anticorps peuvent jouer un rôle important dans l'immunité lorsqu'ils entrent dans des systèmes complexes où interviennent certains facteurs antibactériens des tissus et des humeurs.

A la fin du siècle dernier, de nombreux auteurs ont mis en évidence l'existence de substances antimicrobiennes dans le sang, les leucocytes et les tissus lymphatiques. Dans une revue d'ensemble, Skarnes et Watson notamment, ont réparti ces facteurs nocifs pour les micro-organismes en deux groupes, suivant qu'ils étaient actifs vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Parmi les substances antimicrobiennes actives sur les bactéries de cette dernière catégorie, ils citent le complément, la properdine, le lysozyme, la phagocytine. Nous allons examiner les propriétés qui permettent d'individualiser chacun de ces facteurs antimicrobiens.

I. — *L'ALEXINE.*

En 1888, Nuttall (67) observa que le sang défibriné du chien et du lapin normal * exerçait une action microbicide, plus ou moins prononcée, sur les bactéries à Gram négatif, et que cette propriété disparaissait après chauffage (52 à 55° C) pendant trente à soixante minutes.

* Dans ce texte, nous appelons sujet normal, tout sujet n'ayant pas été vacciné contre les salmonelloses ni contre d'autres affections bactériennes et pour lesquels on n'a pas dans les antécédents la notion d'une infection typhoparatyphoïdique.

L'année suivante, Buchner (17) confirma cette observation et montra en outre, que ce pouvoir destructif se retrouvait dans le sérum normal dépouillé de cellules libres. En 1891, Buchner désigna cette substance thermolabile bactéricide du sérum sous le nom d'*alexine* (18). Dès 1894, Pfeiffer et Issaëff (71) étudièrent les altérations morphologiques subies par des vibrions cholériques atténués, introduits dans la cavité péritonéale de cobayes neufs. Ces vibrions subissant l'effet d'une bactériolyse se transformaient en granules. Ce phénomène pouvait être obtenu avec une intensité particulièrement élevée, sur des souches virulentes résistant normalement à l'effet lytique des sérums normaux, si l'on faisait appel à des sérums d'animaux vaccinés. Bordet (14) montra que cette lyse des vibrions cholériques non pathogènes pouvait s'observer *in vitro* en présence de sérum chauffé d'animal vacciné, additionné de sérum frais de cobaye normal. Cet auteur développa la thèse du mécanisme humoral de l'immunité en montrant que la bactériolyse immunitaire pouvait se manifester dans les liquides, entièrement exempts d'éléments cellulaires. Il reconnut qu'elle résultait de la coopération de deux substances distinctes et indépendantes ; l'une spécifique et thermostable n'est autre que l'anticorps ; l'autre non spécifique et thermolabile se rencontre chez tous les animaux. Bordet identifia cette dernière à l'alexine de Buchner. Ehrlich, à la suite de travaux échelonnés au cours des années 1905, 1906, appela le facteur thermolabile *complément*, et il s'acharna à démontrer que celui-ci s'identifiait à l'alexine de Buchner.

II. — LE COMPLÉMENT.

Le complément, que l'on représente habituellement par le symbole C' , est présent dans le sérum frais ; son activité globale est détruite par un chauffage à 56°C pendant 30 minutes, chauffage qui n'exerce aucun effet appréciable sur les propriétés des anticorps. Le complément n'est pas une substance unique ; il est constitué par au moins quatre composants protéïdiques différents, $C'1$, $C'2$, $C'3$ et $C'4$. $C'3$ a été reconnu lui-même hétérogène et formé de trois composants. Les méthodes qui ont permis de reconnaître l'existence des quatre constituants principaux sont les suivantes :

La dialyse du sérum contre de l'eau distillée, ou mieux, contre un tampon de faible force ionique, à pH 5,4, permet de séparer le sérum en un précipité d'euglobulines et un surnageant de pseudoglobulines. Le précipité contient $C'1$ et $C'3$ alors que le surnageant contient $C'2$ et $C'4$. Le précipité et le surnageant employés séparément sont inactifs, mais leur mélange restaure l'activité.

Le chauffage à 56° C pendant 15 à 20 minutes détruit entièrement C'1 et C'2, alors que C'3 et C'4 sont un peu plus thermostats.

Le composant C'3 est détruit par l'action du venin de Cobra. C'3 est également inactivé par du zymosan, à 37° C pendant une heure, en présence d'ions Mg^{++} . C'3 peut aussi être inactivé par le formol dans certaines conditions qui permettent de respecter l'activité de C'1, C'2 et C'4.

Le composant C'4 est sélectivement inactivé par l'ammoniaque, ou bien l'hydrazine.

De nombreux efforts ont été faits pour isoler sous une forme chimiquement pure les divers constituants du complément. On peut considérer que jusqu'à ce jour, on n'est pas arrivé à les séparer sous une forme suffisamment purifiée pour que l'on puisse préciser de façon certaine leurs propriétés moléculaires. Par contre, on est arrivé à obtenir par des techniques chromatographiques, des fractions impures mais ne contenant qu'un seul des constituants, à l'exclusion des autres.

Le complément possède la propriété de se combiner avec les complexes antigènes-anticorps. Pour Amano et ses collaborateurs (3, 4), le système « anticorps spécifique + complément » est bactéricide et fortement opsonisant, mais non bactériolytique.

En résumé, on peut conclure que le complément est fixé par de nombreux systèmes immunologiques. Il est difficile d'établir dans quelle mesure cette fixation est responsable des événements résultants de la réaction antigène-anticorps. Toutefois, il est certain que la lyse des bactéries et la cytolyse endogène sont étroitement liées à la présence de tous les composés du complément.

III. — *LES ANTICORPS NORMAUX.*

La notion de l'existence d'« anticorps normaux », appelés aussi parfois « anticorps naturels », découle du fait que les sérums normaux sont bactéricides et bactériolytiques comme l'avait établi Buchner. Comment ne pas supposer que ces sérums contiennent en réalité de véritables anticorps spécifiques, jouant le rôle de sensibilisatrices, c'est-à-dire capables de fixer le complément à la surface des bactéries ? De fait, les expériences de Dunlop en 1928 (cité par Skarnes (80)) montrèrent que les sérums normaux, c'est-à-dire provenant de sujets non vaccinés et n'ayant pas de salmonelloses dans leurs antécédents, fixent le complément en présence du bacille d'Eberth pris comme antigène. Si l'on suppose que ces sérums contiennent des anticorps que l'on appellera donc pour la circonstance « normaux ou naturels », il faut admettre qu'ils se différencient nettement de ceux qui se développent chez les sujets vaccinés. Ceux-ci sont en effet des gammaglobulines et donc thermostables alors que les principes actifs des sérums normaux sont thermolabiles et d'une spécificité très discutable. Petterson proposa le terme d'« alphalysine » pour désigner le système lytique normal qui apparaît constitué de deux facteurs thermolabiles, actifs sur les bactéries à Gram négatif ; il les identifia respectivement à l'alexine de Buchner d'une part et à l'anticorps normal ou naturel d'autre part. Mackie et Finkelstein (58) ont étudié le système antibactérien thermolabile du sérum et l'ont trouvé actif uniquement contre les bactéries à Gram négatif. L'action antibactérienne dépendrait du complément et d'un anticorps spécifique. Ce dernier aurait sensibilisé les bactéries à l'action microbicide du complément. Ces auteurs ont suggéré que le sérum normal contiendrait des anticorps spécifiques « naturels » dont le taux augmenterait à la suite de l'inoculation des bactéries. Les agglutinines « naturelles » ont été observées dans le sérum de nombreuses espèces animales et également chez l'homme (Burgi (19), Gibson (41)). Ainsi en 1930, Timmerman (85) montra que le sérum humain normal possédait des agglutinines somatiques O et flagellaires H pour le bacille typhoïdique. Par ailleurs en 1947, Jude (49) d'une part, Melnotte et ses collaborateurs (60) d'autre part, ont montré que des hommes sains, non vaccinés peuvent, dans environ 30 p. 100 des cas, présenter des anticorps « naturels » somatiques et flagellaires, agglutinant les bacilles typhoïdiques et paratyphoïdiques A et B. Cependant l'hypothèse d'atteintes inapparentes ou frustes antérieures ne paraît pas suffire à expliquer la fré-

quence de l'existence d'agglutinines naturelles ; on pourrait admettre avec Jude (50) qu'elles résultent en réalité d'une communauté antigénique entre certains germes pathogènes et des microbes saprophytes banaux de l'homme.

IV. — *LE LYSOZYME.*

En 1922, Flemming (38) mit en évidence le lysozyme dans diverses sécrétions humaines et animales grâce à la propriété que cet enzyme manifeste de dissoudre certaines bactéries à Gram positif (39). Le mécanisme de la lyse est demeuré longtemps incertain : deux hypothèses contradictoires tentaient de l'expliquer. Pour certains auteurs, notamment Boasson, Babudieri, Nemas, Kern, le lysozyme digérait peu à peu le contenu cellulaire des bactéries qu'il lysait, sans en rompre la paroi. Pour d'autres auteurs, notamment Grula, Gauysen, Salton (77), le lysozyme s'attaquait à la paroi bactérienne qu'il arrivait à dissoudre complètement. La synthèse de ces deux thèses en apparence contradictoires, fut réalisée en 1957 par Colobert et Lenoir (23) qui démontrèrent que la clarification des suspensions de bactéries, directement lysables sous l'influence du lysozyme, était la résultante de deux phénomènes, d'une part la destruction de la paroi ectoplasmique, phénomène qui seul est d'origine enzymatique, et d'autre part, la dispersion consécutive et la solubilisation du protoplasme, phénomène régi simplement par les conditions physico-chimiques. Le glycopeptide qui représente le substrat du lysozyme paraît universellement répandu chez les bactéries et les algues bleues et mérite le nom de « constituant fondamental de la paroi bactérienne » que lui a donné Miss Work. Ce constituant fondamental peut se trouver masqué à l'action du lysozyme dans de nombreuses espèces à Gram positif, par d'autres constituants de la paroi, et d'une manière constante dans les bactéries à Gram négatif, par l'antigène somatique qui constitue une enveloppe externe (Colobert et Créach (30), Créach (32). La fonction réelle du lysozyme demeure cependant encore inconnue, et Colobert (26) en a discuté le rôle dans l'autarcèse.

V. — *SYNERGIE FONCTIONNELLE DU LYSOZYME ET DU SYSTÈME ANTICORPS-COMPLÉMENT.*

L'école japonaise d'Osaka (3, 4) a mis en lumière l'importance du lysozyme dans certaines réactions antibactériennes dirigées sur les bactéries à Gram négatif et a conclu qu'« Il est clair que le système

de la bactériolyse immunitaire comprend trois facteurs indépendants : l'anticorps, le complément et le lysozyme ». En effet le lysozyme purifié du blanc d'œuf et le lysozyme des leucocytes accélèrent fortement la lyse de plusieurs espèces bactériennes à Gram négatif, pathogènes, en présence d'antisérum spécifique et de complément. Muschel, Carey et Baron (62) ont décrit l'intervention de systèmes analogues dans la bactériolyse spécifique réalisée *in vitro*.

VI. — LA PROPERDINE.

C'est en étudiant les composants du complément que Pillemer identifia la *properdine* (73). Ce facteur est extrait facilement du sérum, à l'aide du zymosan où il s'adsorbe à 17° C, d'une manière pratiquement totale en soixante-quinze minutes. La properdine humaine est une globuline qui représente 0,03 p. 100 des globulines totales du sérum. Son activité disparaît après chauffage ménagé à 56° C ; elle ne se manifeste qu'en présence d'ions magnésium et d'autres facteurs du complément (56, 89). Le système properdine posséderait une action bactéricide et peut-être une action viro statique. De fortes similitudes paraissant rapprocher la properdine et l'« anticorps normal », certains auteurs ont cru pouvoir les identifier. Cependant les propriétés antibactériennes attribuées par Pillimer à la properdine sont aujourd'hui fortement discutées. Colobert et Kirn (25) n'ont pas hésité à les mettre en doute et ont écrit à ce sujet : « Il n'est pas certain qu'une pétition de principe n'ait pas été introduite dans le raisonnement de Pillemer, puisque pour prouver que la properdine est responsable des propriétés antimicrobiennes du sérum, il en vient à modifier les caractéristiques précédemment admises pour définir la properdine ».

VII. — LE FACTEUR DÉTOXIFIANT DU SÉRUM.

Parmi les autres facteurs antimicrobiens du sang décrits comme actifs sur les bactéries à Gram négatif, il faut citer « l'endotoxin-detoxifying composant » de Landy (plus simplement E.D.C. ou facteur déttoxifiant). Ce facteur qui est présent dans le sérum humain (48), s'absorbe sur le zymosan. Il se montre actif non seulement sur le complexe glucidolipidique endotoxique, mais également sur le constituant lipidique isolé. Pour étudier le facteur déttoxifiant, Landy et ses collaborateurs ont fait appel à la propriété que possèdent les endotoxines de provoquer la nécrose du sarcome expérimental de

la souris ; l'activité détoxifiante est alors appréciée par la diminution de cette propriété. Ils ont ainsi établi (56, 80) que l'activité de l'E.D.C. se manifeste entre les pH de 7 et 9, mais non au-dessous de pH 6 et nécessite une température d'au moins 30° C. Ce facteur antimicrobien est thermolabile ; en effet, un chauffage de 56° C, appliqué pendant une heure, le détruit ; par contre il ne s'altère, dans le sérum conservé à 4° C, qu'au bout de plusieurs mois. Par ailleurs, le facteur détoxifiant est fortement inhibé par les ions Ca^{++} , à des concentrations de l'ordre de celles du sérum (76), de même que par les ions Mg^{++} , Mn^{++} et Ba^{++} , alors que les ions Co^{++} , Cu^{++} et Fe^{++} sont sans action. Le facteur détoxifiant se différencie de la properdine puisqu'il n'est pas absorbable sur le zymosan à 17° C.

VIII. — *LE FACTEUR BACTÉRICIDE DE WEDGWOOD.*

Wedgwood (90) a rapproché de l'E.D.C. le facteur bactéricide qu'il a décrit et qui est actif sur les bactéries à Gram négatif résistantes à la properdine.

IX. — *FACTEURS ANTIMICROBIENS D'ORIGINE CELLULAIRE.*

Au cours de la résistance de l'organisme à l'infection, peuvent également intervenir des facteurs divers d'origine cellulaire notamment d'origine leucocytaire.

Les réactions des tissus enflammés sont de nature complexe, puisqu'elles s'accompagnent de mécanismes phagocytaires. Selon Ungar (86), l'irritation des tissus par les bactéries déclenche toute une série de processus. Une kinase tissulaire active une propeptidase en peptidase ; cette dernière, à son tour, active une protéinase qui hydrolyse les protéines tissulaires. Il se forme ainsi des peptides contenant de 8 à 14 acides aminés qui ont été isolés par Spector (81). Ces peptides augmentent la perméabilité capillaire, et ce faisant, favorisent la diapédèse. Il pourrait s'agir des substances hypothétiques décrites sous les noms de l'exudine et de la leukotaxine. Dans une première phase, ces substances favoriseraient l'accès des microphages, le pH étant légèrement alcalin. Dans une seconde phase caractérisée par l'apparition de macrophages, le pH devient acide. Dans la majorité des cas, les agents infectieux seront anéantis au cours de ce second temps. Dans une troisième phase, il se forme

de la fibrine et l'induration apparaît, localisant l'infection. Dans le même temps, des filaments s'organisent, ce qui favorise la phagocytose, celle-ci s'effectuant le mieux à la surface de ces filaments. Meier et Schär (59) décrivent, dans des travaux récents, des substances d'origine bactérienne qui, même à des concentrations très faibles, accélèrent *in vitro* la migration des leucocytes. Il s'agirait, selon Eichenberger et Schmidt (36), de lipopolysaccharides bactériens pour lesquels la partie lipidique jouerait le rôle prédominant. Enfin, il convient de ne pas oublier les mécanismes de défense cellulaire contrôlés par des facteurs humoraux spécifiques ou non spécifiques.

X. — *ROLE DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES DANS LA RÉSISTANCE NATURELLE.*

Beaucoup de facteurs bactéricides dont nous n'avons cité que ceux qui paraissent bien individualisés, n'ont été étudiés qu'*in vitro* ; il serait donc prématuré de leur attribuer trop d'importance dans l'installation de l'immunité. Pour Skarnes et Watson (79), les facteurs tissulaires antimicrobiens, dans la résistance aux infections, représenteraient un aspect du système de défense de l'organisme. Ces substances n'existeraient pas, comme telles, dans les tissus normaux, mais elles apparaîtraient en réponse aux changements physiologiques qui accompagnent le « stress ». Elles permettraient ainsi aux systèmes de défenses spécifiques d'opérer plus efficacement pour neutraliser ou éliminer des tissus, les agents d'agression.

A maintes reprises, on s'est efforcé d'augmenter la résistance d'animaux par l'injection intraveineuse de divers composés microbiens. Ainsi, Wesphal et ses collaborateurs (93) ont remarqué que l'injection de parois cellulaires de certaines bactéries à Gram négatif stimulait la biosynthèse de la properdine et provoquait une augmentation de la résistance des animaux de laboratoire à une infection ultérieure. Les lipopolysaccharides des parois cellulaires en sont les principes actifs ; ils peuvent être remplacés par une substance contenant presque exclusivement des lipides. La properdine n'est pas la seule à être augmentée après l'injection de lipopolysaccharides, le lysozyme présente également une élévation de son taux. Tout le système réticulo-endothélial est stimulé et ainsi sont exaltés de nombreux mécanismes de défense ; ce fait pourrait être dû, entre autres, au pouvoir opsonisant de la properdine, récemment démontré par

Nanni (63). Nous sommes encore loin de pouvoir mettre en relation la résistance d'un individu avec les mécanismes décrits. Il doit exister de nombreux facteurs — souvent décrits sous le terme général de « constitution » — pour lesquels nos connaissances sont encore très incomplètes. Ces substances antimicrobiennes interviendraient dans « l'autarcèse » qui est, d'après Aycock (5), « le pouvoir protecteur contre la maladie dont jouit l'organisme en raison d'une activité physiologique normale et équilibrée, se différenciant de l'immunité ayant pour support des substances spécifiques se formant à la suite de l'invasion de l'organisme par l'agent pathogène. Alors que le sujet en état d'équilibre autarcéologique répondra après contact avec l'agresseur par l'immunité, un organisme mal équilibré répondra par la maladie. »

CHAPITRE III

L'OBSISTINE

En étudiant les propriétés lytiques du sérum humain normal vis-à-vis de diverses espèces bactériennes à Gram négatif, Colobert et Kirn, (24, 25) ont individualisé un facteur lytique qui ne paraît identifiable à aucun de ceux décrits dans la littérature. Pour mettre en évidence les propriétés bactériolytiques du sérum, il suffit d'opérer en présence de phosphates. Dans ces conditions, on observe au photomètre une diminution rapide et profonde de l'opacité de suspensions de nombreuses espèces bactériennes, notamment d'*Eberthella typhi* (souche 0-901), *Salmonella para A* (Durazzo), *Salmonella para B* (Reading), *Escherichia coli* (mutabile), *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*. Tout au contraire des espèces voisines ne sont pas lysées, c'est le cas de *Salmonella para C* (Kunzendorf), *Salmonella Newport*, *Salmonella enteridis* (Dublin), *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis* (P 18) et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'activité lytique est optimale à $\text{pH} = 7$, et les conditions où les auteurs se sont habituellement placés pour l'observer sont les suivantes. Dans la cuve de section carrée (1 cm de côté) du photomètre tricellule Jobin et Yvon, équipé de l'écran sélectif de la longueur d'onde 780 $\text{m}\mu$, on place 3 ml de dilution au 1/3 du sérum à étudier dans un tampon phosphate 0,066 M de $\text{pH} = 7$. On ajoute 1 ml de suspension de bactéries dans le même tampon, ajustée au préalable de telle manière, que diluée 10 fois sa densité optique soit de 0,400. La dilution finale est donc de 1/4, la densité optique est égale à 1. La température équilibrée au départ est maintenue fixe, habituellement à 37°C. Il fut établi que dans une zone convenable de dilutions d'un sérum donné, il existe une excellente proportionnalité entre la dilution et l'intensité de la lyse mesurée au photomètre au bout d'un temps donné, pourvu que celui-ci soit supérieur à 20 minutes. Cette pro-

priété peut être utilisée pour le dosage de l'activité lytique, mais l'appréciation du degré de lyse devra toujours être effectuée sur trois dilutions au moins du sérum, car il est indispensable de vérifier que l'on se trouve bien dans la zone de proportionnalité.

L'étude morphologique, réalisée soit au microscope photonique en contraste de phase ou après imprégnation argentique par la méthode de Fontana-Tribondeau, soit au microscope électronique, a permis d'établir que la paroi ectoplasmique des bactéries est totalement détruite au cours de la lyse (25). Celle-ci débute par la transformation des bactéries en éléments sphériques dont le diamètre est de l'ordre de grandeur de la longueur des bacilles. Ces éléments sont morphologiquement identiques à ceux que l'on peut obtenir par des procédés divers (15), et que Mac Quillen a proposé de désigner sous le nom de sphéroplastes, ce qui a l'avantage de ne rien présumer de leur nature. Cette transformation en sphéroplastes sous l'influence du sérum est connue depuis les travaux de Pfeiffer, et a donné encore lieu à des études récentes (62), mais elle était considérée jusqu'ici comme impliquant l'intervention d'anticorps spécifiques, du complément et parfois du lysozyme. Pour éviter des confusions, Colobert et Kirn désignent sous le nom d'obsistine (du latin *obsistere*, s'opposer), le système bactériolytique non spécifique qu'ils ont décrit.

Après dialyse du sérum sanguin ou du plasma citraté contre du tampon acétate de sodium-acide acétique 0,02 M de pH = 5,5, c'est-à-dire dans des conditions qui entraînent à la fois la précipitation de la properdine, du troisième composant du complément et des englobulines (62), on ne retrouve aucune activité lytique dans le précipité redissous en tampon phosphate, et seulement une activité partielle dans le surnageant du sac de dialyse. Mais le mélange des deux fractions dans des proportions relatives correspondant à celles où elles se trouvent dans le sérum, restaure l'activité lytique primitive. Ces propriétés suffisent à différencier l'obsistine de la properdine. D'ailleurs, l'affinité de l'obsistine pour le zymosan est différente de celle de la properdine ; elle n'est pas adsorbable sur le zymosan à 17°C dans les conditions indiquées par Pillemer (73), mais elle l'est en revanche à 37°C.

L'obsistine est inactivée quand on chauffe le sérum soixante minutes à 50°C, trois minutes à 56°C, ou une minute à 62°C. Cette thermostabilité permet de la distinguer des facteurs antimicrobiens thermostables notamment du lysozyme et des anticorps. L'obsistine ne peut non plus être identifiée aux facteurs thermolabiles du complément

car l'addition de sérum frais de cobaye à du sérum humain inactivé par passage sur le zymosan à 37°C, ne restaure aucune activité lytique.

Il est remarquable que l'obsistine qui manifeste une propriété si spectaculaire en présence de phosphates, paraisse totalement inhibée dans le sérum pur, et partiellement dans du sérum dilué dans de l'eau. Il semble que ce phénomène soit dû à des influences ioniques. On a constaté en effet que l'ion calcium inhibe l'activité lytique aux concentrations où il se trouve dans le sang. De même, l'ion magnésium manifeste un effet analogue à des concentrations aussi faibles que 0,007 M, et l'inhibition devient totale pour 0,04 M. Cette action ne provient pas simplement de l'augmentation de la force ionique du milieu ; en maintenant constante la force ionique ($\mu = 0,12$), soit à l'aide de chlorure de sodium, soit à l'aide de chlorure de calcium, on trouve que l'activité lytique observée dans le premier cas est très supérieure à celle observée dans le second.

Très récemment, Colobert et Feitz * ont pu isoler du sérum, par précipitation par les phosphates, deux fractions individuellement inactives, mais dont le mélange restaure l'activité lytique au point même que celle-ci est parfois supérieure à celle du sérum complet initial. Colobert et Kirn estiment que l'obsistine est susceptible de jouer un rôle important non seulement dans l'immunité naturelle, mais également dans l'immunité acquise. Ils se fondent notamment sur le fait que chez le singe le taux de l'obsistine s'accroît au cours de la vaccination TAB et d'autre part, sur le fait que l'antigène Vi confère une résistance marquée aux bactéries vis-à-vis de l'activité lytique de l'obsistine, ce qui permet d'interpréter le rôle joué par cet antigène dans la virulence (27). Ils ont montré d'autre part (8), que des perturbations dans le développement du titre de l'obsistine se manifestent chez le singe quand on lui injecte à la fois du vaccin antipoliomyélitique et du vaccin TAB. Chez les animaux qui ont reçu ce mélange, la montée du titre de l'obsistine est beaucoup moins marquée que celle observée chez les animaux qui ont reçu le vaccin TAB seul (28, 29). C'est dans le cadre de ces travaux que le médecin-lieutenant-colonel Colobert nous a demandé de suivre le titre de l'obsistine chez l'homme à la suite de la vaccination réglementaire dans l'armée par le vaccin DT.TAB de l'Institut Pasteur.

* Travaux personnels, non publiés.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE IV

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Nous exposerons dans ce chapitre les caractéristiques du vaccin utilisé, la technique de vaccination mise en œuvre, celle de préparation des fractions F1 et F2, puis le titrage de l'obsistine et la méthode qui nous a permis de mettre en évidence l'influence de ces fractions F1 et F2 sur l'activité lytique.

I. — CARACTÉRISTIQUES DU VACCIN UTILISÉ.

Le vaccin utilisé est le vaccin antidiphtérique, antitétanique, antitypho-paratyphoïdique de l'Institut Pasteur (DT.TAB) (13). Sa composition est la suivante : 12,5 unités internationales d'anatoxine diphtérique, 6,25 unités internationales d'anatoxine tétanique, 425 millions de bacilles d'Eberth, 150 millions de bacilles paratyphiques A, 275 millions de bacilles paratyphiques B tués par simple chauffage d'une heure à 56° C. Les souches qui entrent dans la composition de ce vaccin sont de provenance et d'origine variées. L'étude biochimique et sérologique des souches met en œuvre des examens qui portent sur les caractères morphologiques et tincto-riaux, sur les propriétés biochimiques et les constitutions antigéniques. On ne retient que les colonies S ou lisses de *Salmonella typhi* IX, (XII), Vi, d, de *Salmonella paratyphi* A I, II, (VII), a,

de *Salmonella paratyphi* B IV, V, (XII), b, 1, 2. La détermination de la richesse en antigène O se fait par la technique de Boivin à l'acide trichloracétique. La détermination de la teneur en antigène Vi se fait par appréciation de l'importance du précipité qui apparaît lorsque l'extrait trichloracétique est additionné de sels d'uranyle. On procède alors aux épreuves de toxicité sur le cobaye, aux épreuves de vaccination de la souris avec dosage des agglutinines O, H, Vi et contre-épreuve par injection intrapéritonéale de germes vivants de la souche Ty 2 avec un lot témoin ; enfin, au cours de l'épreuve d'immunisation du lapin, le pouvoir protecteur du sérum est éprouvé. Ce vaccin est préparé à l'aide de souches éprouvées qui sontensemencées sur milieu gélosé en boîtes de Roux. Ces boîtes sont portées vingt-quatre heures à l'étuve à 37° C. La suspension microbienne est recueillie dans de l'eau salée à 8,5 g ‰ ; la purée obtenue est répartie en ballons de 300 millilitres, scellés et chauffés pendant une heure, à 56° C, au bain-marie, avec agitation. La numération des bacilles s'effectue à l'aide de l'électro-photomètre de Meunier, la pureté de chacun des échantillons est contrôlée.

Ce vaccin est délivré en ampoules de deux millilitres (par boîte d'une ou de trois ampoules) pour vaccination individuelle et en ampoules de dix millilitres (par boîte de dix) pour vaccinations collectives. L'étiquette de chaque boîte porte un numéro d'ordre correspondant à la série de préparation et une date limite d'utilisation. Ce vaccin doit être conservé à l'abri de la lumière et de la chaleur ; toute ampoule ouverte doit être utilisée sans délai.

II. — PRATIQUE DES VACCINATIONS.

Le matériel utilisé pour les injections vaccinales est exclusivement réservé à cet usage ; son asepsie est effectuée par la chaleur sèche, à 180° C pendant trente minutes, dans un appareil de type Poupinel. Les aiguilles et les seringues utilisées sont individuelles. La veille de la vaccination, les patients se sont reposés ; le matin de la vaccination, ils sont à jeun ; par ailleurs, on leur fait une analyse d'urine à la recherche d'une protéinurie ou d'une glycosurie éventuelles. Chaque sujet est vacciné en position assise après asepsie de la peau assurée par une couche d'alcool iodé appliquée quelques minutes avant l'injection. Celle-ci s'effectue dans la région externe de la fosse sous-épineuse, en plein tissu cellulaire sous-cutané. Après la vaccination, les sujets gardent la chambre, ils absorbent une ali-

mentation liquide sans alcool pendant 48 heures. La vaccination avec le vaccin associé DT.TAB comporte trois injections espacées de quinze jours ; les doses administrées sont respectivement 1, 2, 2 millilitres pour l'adulte. L'injection de rappel pratiquée l'année suivante est de 2 millilitres, les injections de rappel ultérieures se font à la même dose.

III. — PRÉPARATION DES DEUX FRACTIONS F1 ET F2.

Colobert et Feitz ont cherché à fractionner et à purifier le, ou les principes responsables de l'activité lytique de l'obsistine. Ils ont fait appel aux techniques classiques de précipitation des protéines sériques par les sels, ce qui leur a permis d'obtenir à partir de sérum humain normal deux fractions, chacune étant individuellement dépourvue d'action lytique, mais leur réunion restaurant l'activité lytique primitive.

Les sérums utilisés ont été prélevés chez des sujets adultes, sains. On opère sur le mélange des sérums d'environ quinze donneurs, de façon à limiter les variations individuelles. La séparation du caillot est pratiquée vingt-quatre heures après le prélèvement. Le sérum stérile peut être conservé quelques jours à $+ 4^{\circ} \text{C}$ sans précautions particulières jusqu'à son utilisation. L'activité lytique est éprouvée avant la préparation des deux fractions par un titrage de l'obsistine.

Le réactif précipitant utilisé est un mélange équimoléculaire de phosphates mono et bipotassiques 4 M (272 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ et 348,36 g de PO_4HK_2 , on ajuste à 1 000 ml avec de l'eau distillée). A un volume V de sérum on ajoute goutte à goutte un volume de solution de phosphates tel que la concentration finale en phosphate atteigne la valeur 1,5 M. Après quatre heures d'attente à $+ 4^{\circ} \text{C}$, on collecte le précipité par centrifugation à froid. On dissout le culot dans une quantité de soluté 0,15 M de chlorure de sodium égale au quart du volume primitif du sérum. Cette solution protéinique contient des quantités importantes de phosphates mono et bipotassiques dont on se débarrasse en grande partie par dialyse effectuée à $+ 4^{\circ} \text{C}$, sous agitation, pendant vingt-quatre heures, contre six litres de soluté de chlorure de sodium 0,15 M. Le contenu du sac de dialyse est alors versé dans une éprouvette graduée et on complète le volume recueilli, à la moitié du volume initial du sérum, à l'aide du soluté chlorure sodique. On obtient ainsi F1.

On mesure le volume du surnageant, obtenu précédemment, dans une éprouvette graduée et on ajoute goutte à goutte une quantité de solution de phosphates mono et bipotassiques 4 M, telle que la solution finale soit amenée à la concentration saline 2,5 M. Le précipité obtenu est laissé quatre heures à 4° C puis on centrifuge à froid. Comme le précipité surnage, on décante la phase liquide par aspiration et on dissout le précipité dans le minimum d'eau distillée nécessaire. On élimine en grande partie les phosphates mono et bipotassiques par dialyse, contre six litres d'eau distillée, pendant vingt-quatre heures à + 4° C, avec agitation. On élimine par centrifugation, sans perte d'activité, le précipité de nature vraisemblablement englobulique qui apparaît au cours de la dialyse. Le surnageant est placé dans une éprouvette graduée et le volume est complété à la moitié du volume initial du sérum à l'aide d'eau distillée. On obtient ainsi F2.

F2 peut être conservé pendant plusieurs jours à + 4° C sans s'altérer, mais F1 en solution ne peut être conservé plus de quarante-huit heures.

IV. — DOSAGE DE L'OBSISTINE.

Nous avons utilisé la technique décrite par Colobert et Kirn (28). Ce titrage est rendu difficile par l'interférence de divers facteurs du sérum. Ainsi, lorsqu'on suit la lyse d'une suspension d'*Eberthella typhi* souche 0-901 dans les conditions optima (Colobert et Kirn (25), on constate que celle-ci ne débute pas immédiatement après l'addition du sérum, mais après un certain temps de latence, variable d'un sujet à l'autre. Pour titrer l'obsistine, il est nécessaire de diluer suffisamment le sérum pour que cet effet devienne négligeable. De fait, comme l'ont déjà indiqué Colobert et Kirn (28), on trouve ordinairement une zone de dilutions où se manifeste une proportionnalité entre l'intensité de la lyse mesurée au bout d'un temps donné et la quantité de sérum utilisée. La pente de la droite représentative, c'est-à-dire la quantité de bactéries détruites au bout d'un temps unité par un volume unité de sérum, peut servir de mesure relative du titre en obsistine. Au point de vue pratique, on commence par réaliser une suspension d'*Eberthella typhi* souche 0-901 dans un tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2 les bactéries étant récoltées après culture de seize heures à 37°C sur gélose nutritive inclinée.

L'opacité de la suspension bactérienne est ajustée de telle manière que la densité optique de cette suspension diluée au 1/4 dans le tampon et mesurée à 700 m μ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, soit égale à 0,83.

Dans une série de tubes à essais, on distribue respectivement 0,10, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40 et 0,50 ml de sérum à étudier. On complète à 3 ml à l'aide du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2. On place dans un thermostat à 37°C le flacon contenant la suspension bactérienne et les six tubes contenant les dilutions de sérum. Lorsque l'équilibre de la température est réalisé, on ajoute 1 ml de la suspension bactérienne dans chacun des tubes. Au bout de trente minutes exactement, on agite et on lit la densité optique. Celle-ci doit être égale à 0,78 dans le tube témoin n'ayant pas reçu de sérum *. Sur un papier millimétré on porte en abscisses les volumes de sérum utilisés et en ordonnées les densités optiques correspondantes lues à la trentième minute. Habituellement, tous les points obtenus ne sont pas alignés, mais il est en général possible de trouver trois ou quatre points consécutifs alignés permettant de tracer la droite. S'il n'en est pas ainsi, on doit reprendre le titrage avec des volumes de sérum plus faibles : 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,25 ml. Sauf dans des cas exceptionnels, on observe au moins trois points consécutifs alignés permettant de tracer la droite (fig. 1).

On calcule alors la pente de la droite en faisant le rapport, pour une quantité donnée de sérum, de la diminution d'opacité exprimée en densité optique par cette quantité de sérum exprimée en millilitres. Pour éviter que les valeurs ainsi obtenues soient trop petites, on multiplie le résultat par un coefficient égal à 10. Si μ_1 représente la densité optique à la trentième minute correspondant à un volume en millilitres V_1 de sérum et μ_2 la densité optique correspondant à un volume V_2 , le titre T est donné par la formule

$$T = \frac{\mu_1 - \mu_2}{V_2 - V_1} \times 10.$$

* 60 divisions du tambour du photomètre tricellule Jobin et Yvon.

A titre d'exemple, sur la courbe A de la figure 1 on lit que pour 0,2 ml de sérum la densité optique correspondante est de 0,73. Pour 0,5 ml de sérum, elle est de 0,52. La diminution de la densité

optique due à la lyse par l'obsistine est donc de $\frac{0,73 - 0,52}{0,5 - 0,2} = 0,7$.

En multipliant cette valeur par 10, on obtient le titre du sérum, égal ici à 7 unités/ml.

Dans le cas de la courbe B de la figure 1, en lisant par exemple les densités optiques correspondant aux valeurs 0,3 et 0,1 ml de sérum,

on trouve : $\frac{0,75 - 0,23}{0,3 - 0,1} \times 10 = 26$ unités/ml.

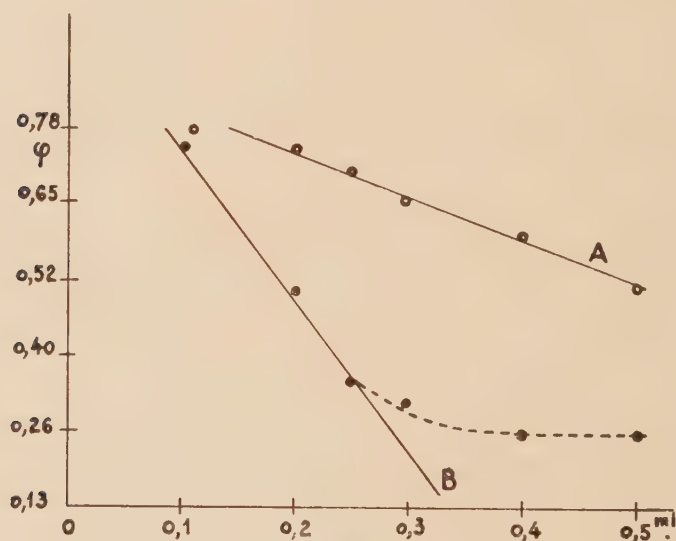


FIGURE 1

Titration de l'obsistine. En abscisses, le volume de sérum introduit dans le milieu réactionnel. En ordonnées, la densité optique de la suspension bactérienne au bout de trente minutes à 37° C.

Dans la pratique, nous avons porté en abscisses, non pas la densité optique, mais des valeurs proportionnelles aux densités optiques lues directement sur le cadran du photomètre (photomètre tricellule Jobin et Yvon).

Le dosage consiste donc à introduire dans une suspension de bactéries, réalisée dans des conditions normalisées, des quantités

croissantes de sérum sanguin et à déterminer au photomètre la quantité de bactéries lysées après une inoculation du mélange réactionnel pendant trente minutes à 37° C.

a) *Préparation de la suspension bactérienne.* — La bactérie utilisée est la souche 0-901 d'*Eberthella typhi*, dont la composition antigénique est IX, XII₁, XII₂, XIII₃ et se trouve exempte d'antigène VI et peu riche en antigène flagellaire. Les bactéries sont cultivées sur gélose nutritive inclinée. Le milieu de culture est préparé de la façon suivante :

On fait dissoudre dans un litre d'eau du robinet 5 g d'extrait de bouillon de viande auquel on ajoute 10 g de peptone tryptique. Le pH est ajusté à 7,4 par addition de soude. On incorpore à ce mélange 20 g de gélose. Cette solution est précipitée à 120° C pendant vingt minutes. On filtre sur coton et on répartit en tubes à raison de 10 ml par tube. Ces tubes sont stérilisés à l'autoclave à 110° C puis inclinés.

La bactérie d'épreuve, cultivée sur ce milieu, est récoltée après seize heures de culture à 37° C, par raclage et mise en suspension dans du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2. Cette solution tampon est préparée à l'aide de 16,717 g de PO₄HNa₂, 12 H₂O, de 2,723 g de PO₄H₂K ajustée à un litre avec de l'eau distillée. On ajuste la suspension bactérienne de telle manière que diluée au quart dans le tampon, sa densité optique mesurée à 700 mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur amène le tambour du spectro-photomètre tricellule Jobin et Yvon, type Congo, à la division 63. La suspension bactérienne ainsi ajustée peut être conservée sans inconvénient pendant douze heures à + 4° C.

b) *Mise en évidence de l'effet des fractions F1 et F2 sur l'activité lytique.* — Dans la technique du dosage utilisée par Colobert et Kirn, et telle que nous venons de la décrire, le volume final est ajusté à 4 ml par addition respective de 2,90, 2,80, 2,75, 2,70, 2,60 et 2,50 ml de tampon phosphore dans les tubes ayant reçu 0,10, 2,20, 0,25, 0,30, 0,40 et 0,50 ml de sérum à étudier, et par addition de 1 ml de suspension bactérienne. Pour mettre en évidence l'effet d'une fraction (F1 ou F2), nous avons ajouté respectivement dans chaque tube un volume de la fraction F1 ou F2 égal à celui du sérum et on a ajouté une quantité de tampon phosphate telle qu'après l'addition de 1 ml de la suspension bactérienne le volume final soit de 4 ml. Parallèlement le titrage de l'obsistine a été réalisé par le procédé ordinaire. La fraction F1 contenant une concentration de chlorure de sodium de 9 g par litre, nous avons vérifié dans des essais préliminaires que le sel à cette concentration ne modifiait en rien l'activité lytique du système.

TABLEAU I

Variations du titre de l'obsistine chez les sujets ayant reçu la vaccination DT.TAB.

Sérum A : La veille de la première injection.

Sérum B : 12 jours après la première injection.

Sérum C : 12 jours après la deuxième injection.

Sérum D : 12 jours après la troisième injection.

Sérum E : 2 mois après la troisième injection.

Sérum F : 6 mois après la troisième injection.

	Date des Prélèvements de sérum					
	A	B	C	D	E	F
1	85	76	85	60		70
2	47	76	90	130	170	85
3	20	65	60	70	60	57
4	35	60	40	30	20	50
5	40	65	65	50	60	90
6	37	60	70	60	25	63
7	53	60	70	65	80	73
8	40	120	105	25	25	60
9	100	80	82	46	25	63
10	75	63	62	15	60	93
11	10	5	5	8	15	15
12	53	53	53	20	18	56
13	27	70	80	50	25	50
14	70	210	160	20	20	73
15	36	120	65	40	25	45
16	16	110	100	60	27	56
17	62	200	170	220	115	83
18	10	60	43	33	80	53
19	10	16	25	27	22	73
20	10	120	50	100	50	56
21	17	12	20	25	30	63
22	13	140	140	80		80
23	27	63	37	33	15	60
24	17	60	50	27	15	46
25	46	73	130	213	125	72
26	63	83	115	146	120	115
27	43	105	66	7	20	
28	46	130	70	95	46	
29	8	60	37	75		
30	70	57	22	100		
31	13	45	15	80		
32	47	25	9	55		
33	35	53	37			
34	16	55	13	16		
35	75	90	95	45		
36	10	16	190	67		
37	20	42	48	47		
38	31	32	50	55		
39	20	31	50	100		
40	30	25	10	13		
41	72	77	162	18		
42	17	57	97	18		
43	20	12	95	175		
44	22	50	95	154		
45	16	33	85	155		
46	23	32	110	145		
47	14	45	53	150		
48	25	25	105	83		
49	40	85	140	97		
50	19	16	17	113		
51	22	16	12	150		
52	26	130	20	130		

CHAPITRE V

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. — *VARIATIONS DU TITRE DE L'OBSISTINE AU COURS DE LA VACCINATION.*

Nous avons étudié en premier lieu la variation du titre de l'obsistine au cours de la vaccination chez 52 jeunes élèves de l'Ecole du Service de Santé Militaire. Ces sujets ont été choisis pour n'avoir pas été antérieurement vaccinés contre les salmonelloses. Des échantillons de sang leur furent prélevés par ponction des veines de l'avant-bras, d'une part la veille de la première injection vaccinale (sérum A), d'autre part douze jours après chacune des injections vaccinales réglementaires (respectivement sérums B, C, D). En outre, 28 de ces sujets subirent deux prélèvements supplémentaires respectivement deux et six mois après la dernière injection (respectivement sérums E, F)

Le vaccin utilisé fut le vaccin associé DT.TAB de l'Institut Pasteur de Paris dont nous avons donné la composition dans le chapitre précédent. Les trois injections réglementaires furent pratiquées suivant la technique habituelle à quinze jours d'intervalle. Les doses administrées furent respectivement de 1, 2 et 2 ml.

Sur les échantillons de sang prélevés de manière aseptique, on préleva le sérum après centrifugation. Les différents échantillons de sérum répartis dans des flacons stériles, furent conservés au réfrigérateur, où leur activité lytique se conserve et utilisés dans les quinze jours.

Nous procédâmes ensuite au titrage de l'activité lytique par la technique exposée au chapitre précédent. Les résultats de ce titrage sont présentés dans le tableau I.

L'examen de détail fait apparaître que la première injection provoque une augmentation du taux de l'obsistine chez 80 p. 100 des sujets. Dans la moitié des cas, il s'agit d'une montée modérée, en revanche les autres accusent une montée très accentuée. Quant aux 20 p. 100 de sujets restants, non seulement l'injection n'a pas provoqué de montée de l'obsistine, mais elle a provoqué tout au contraire une baisse, en général modérée.

La seconde injection vaccinale accentue encore ce phénomène, on observe que chez 50 p. 100 des sujets le taux d'obsistine s'accroît encore quoique de façon plus modérée qu'après la première injection. En revanche, chez 25 p. 100 des sujets on observe une baisse marquée du taux d'obsistine qui peut même, dans certains cas, se trouver inférieur à la valeur initiale avant toute vaccination. Ceci s'observe tout particulièrement dans le lot des sujets qui ont acquis un taux élevé à la suite de la première injection (50 p. 100 d'entre eux).

Au terme de la vaccination, c'est-à-dire après la troisième injection, 75 p. 100 des sujets présentent une activité lytique supérieure à celle de départ. En somme, les variations enregistrées sont de différents types. Elles sont soit faibles et régulières, soit fortes avec brusque fléchissement de l'activité lytique après la seconde ou la troisième injection.

L'examen des sérums E et F nous fait assister, surtout en ce qui concerne les seconds, à une stabilisation du titre de l'obsistine à un niveau nettement supérieur à celui du départ, même chez les sujets qui avaient présenté un brusque fléchissement après la seconde ou la troisième injection.

Ces données sont résumées dans les figures 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8.

L'histogramme correspondant au sérum A (fig. 2), montre que l'activité lytique est faible avant la vaccination, la médiane qui intéresse 75 p. 100 des sujets se situe autour de 20 unités d'obsistine. Les autres sérums ont un titre plus élevé qui cependant n'excède pas 100 unités.

Les histogrammes des sérums B, C et D (respectivement fig. 3, 4 et 5), montrent un étalement important des fréquences sans médiane bien individualisée. Les deux histogrammes correspondant au sérum E et surtout au sérum F (fig. 6 et 7), montrent un regroupement des fréquences autour d'une médiane se situant vers 60 unités d'obsistine.

FIGURE 2

Histogramme correspondant aux sérums A prélevés la veille de la première injection vaccinale (52 sérums). En abscisses, le titre exprimé en unité conventionnelle d'obsistine. En ordonnées, la fréquence exprimée en pourcentage.

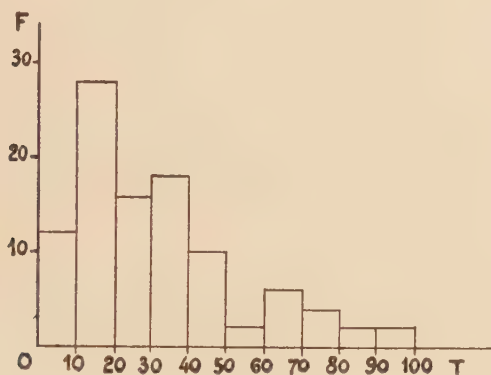


FIGURE 3

Histogramme correspondant aux sérums B prélevés douze jours après la première injection vaccinale (52 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.

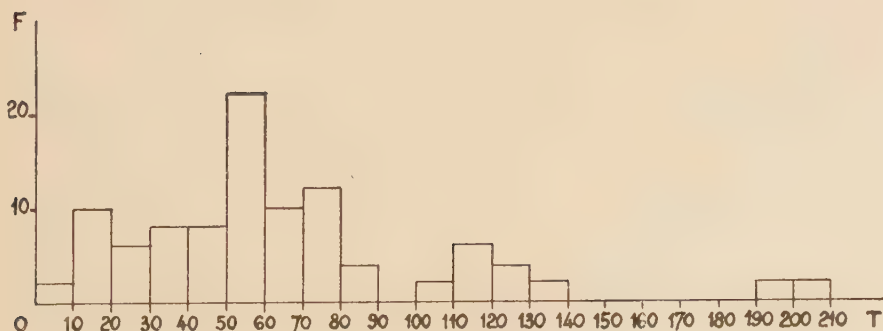


FIGURE 4

Histogramme correspondant aux sérums C prélevés douze jours après la seconde injection vaccinale (52 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.

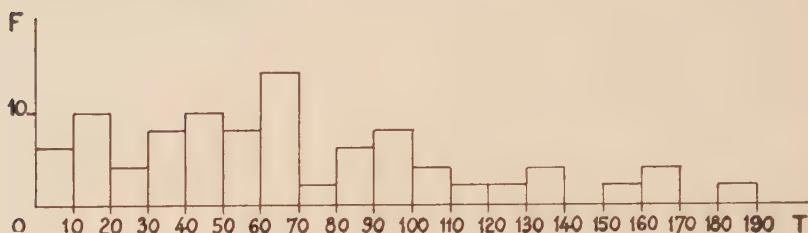


FIGURE 5

Histogramme correspondant aux sérums D prélevés douze jours après la troisième injection vaccinale (52 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.

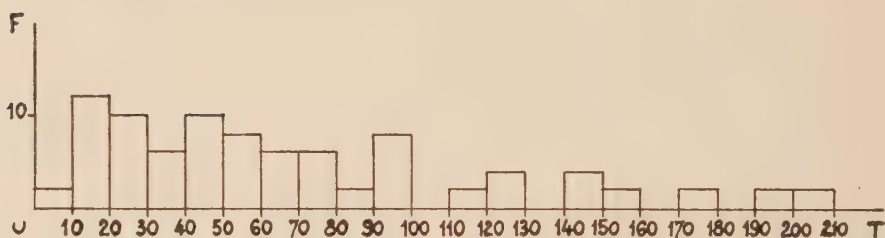


FIGURE 6

Histogramme correspondant aux sérums E prélevés deux mois après la troisième injection vaccinale (28 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.

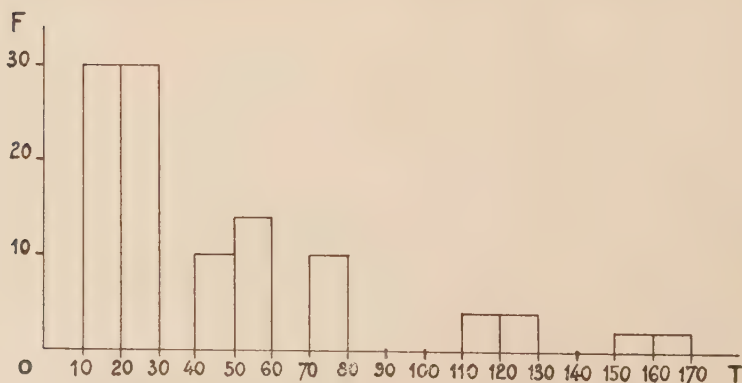


FIGURE 7

Histogramme correspondant aux sérums F prélevés six mois après la troisième injection vaccinale (28 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.

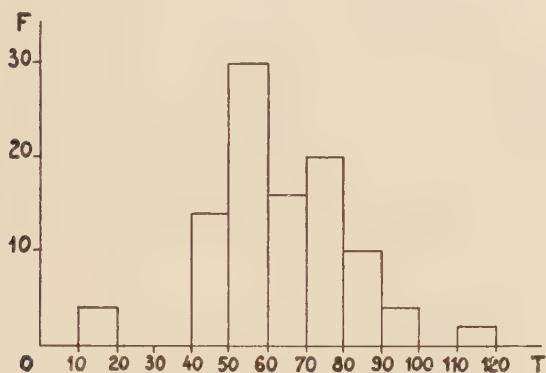
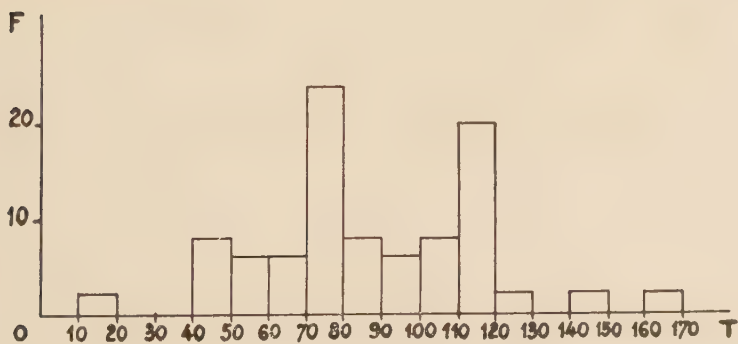


FIGURE 8

Histogramme correspondant aux sérums G prélevés la veille de l'injection de rappel (35 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.



Un an plus tard (sérum G), l'histogramme pratiqué avant l'injection de rappel (fig. 8) montre que le titre de l'obsistine se relève considérablement. En effet, on assiste à un regroupement des fréquences autour d'une médiane correspondant à 80 unités, alors que le taux de départ avoisinait 20 unités.

Au point de vue statistique, il semble donc certain que la vaccination a eu pour effet d'accroître le taux de l'obsistine dans le sérum des vaccinés. Mais ce phénomène s'est déroulé très lentement puisqu'il n'a commencé à se dessiner qu'au bout de six mois et qu'il s'est entièrement révélé un an après la vaccination. Au cours des trois premiers mois qui ont suivi la première injection vaccinale, on assiste à des phénomènes complexes, parfois diamétralement opposés suivant les sujets, chacun d'eux semblant réagir différemment sous l'action de la vaccination.

II. — DÉVELOPPEMENT DES DIFFÉRENTS FACTEURS ENTRANT DANS LA COMPOSITION DE L'OBSISTINE AU COURS DE LA VACCINATION.

Quand l'activité lytique des sérums est faible, il est très facile d'aligner les points expérimentaux, autrement dit, l'intensité de la lyse est très sensiblement proportionnelle à la quantité de sérum introduite. En revanche, dans les sérums très actifs, on constate un changement de pente de la courbe (fig. 10). Devant ce phénomène on peut imaginer deux hypothèses, tenu compte du fait que nous savons que l'obsistine est un système complexe constitué d'au moins deux facteurs (F1 et F2).

On peut tout d'abord supposer qu'il existe un inhibiteur qui se développerait dans le sérum des vaccinés parallèlement à la vaccination, capable de provoquer des interactions complexes avec l'un ou l'autre des facteurs jouant un rôle dans le système de l'obsistine. On pourrait admettre par exemple que l'activité ne se manifesterait avec son intensité maximale que lorsque une quantité suffisante de sérum est introduite dans le milieu réactionnel.

Dans une seconde hypothèse, on peut imaginer que les différents facteurs, entrant dans la constitution du système de l'obsistine, se développeraient d'une manière non parallèle au cours de la vaccination. Dans ce cas, il suffirait d'introduire dans le milieu réactionnel une quantité suffisante du, ou des facteurs déficients pour potentialiser

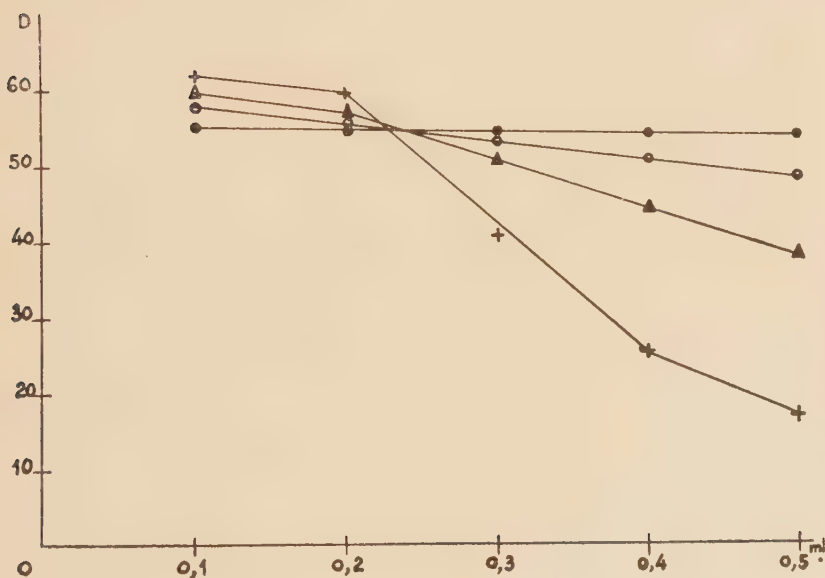
FIGURE 10

Titration de l'obsistine au cours de la vaccination DT.TAB sur un même sujet.

- Sérum A prélevé la veille de la première injection vaccinale.
- Sérum B prélevé 12 jours après la première injection vaccinale.
- + Sérum C prélevé 12 jours après la seconde injection vaccinale.
- △ Sérum D prélevé 12 jours après la troisième injection vaccinale.

En abscisses, les volumes de sérums à éprouver introduits dans le milieu réactionnel exprimés en millilitres. En ordonnées, la densité optique du milieu réactionnel exprimée en unités conventionnelles.

Dans le cas des prélèvements A et B où l'activité lytique est faible, et dans le cas du prélèvement D où elle est modérée, les points expérimentaux s'alignent. En revanche, dans le cas du prélèvement C où l'activité lytique est extrêmement marquée, on observe deux brusques changements de pente. C'est la pente du segment intermédiaire qui mesure le titre d'obsistine.



l'activité lytique et lui permettre d'atteindre son intensité maximale. Nous avons tenté de vérifier chacune de ces deux hypothèses.

a) *Influence des anticorps sur l'activité lytique.* — Dans le cadre de la première hypothèse, nous avons cherché à voir si les anticorps, notamment les agglutinines qui se développent à la suite de la vaccination, n'interfèrent pas sur l'activité lytique. Pour cela, dans une première série d'expériences, nous avons ajouté au sérum des vaccinés, présentant une forte activité lytique, des polysaccharides extraits de l'antigène somatique que représentent les haptènes spécifiques correspondant aux agglutinines. Ceux-ci, en se fixant sur les anticorps, devraient pouvoir bloquer l'action inhibitrice éventuelle des agglutinines dans la lyse. Le mode opératoire est le suivant.

On prépare l'antigène somatique d'*Eberthella typhi* par la méthode de Westphal au phénol aqueux (92, 93). L'antigène somatique est hydrolysé par l'acide chlorhydrique N à 100° C pendant trente minutes sous reflux. Les lipides libérés sont éliminés par filtration ; la solution aqueuse contient le polyoside. On neutralise le filtrat en présence de phénolphthaléine puis on dialyse jusqu'à élimination complète des sels et on lyophilise. Dans ces conditions, qui sont celles indiquées par Westphal, on obtient bien un polyoside dont le pouvoir haptène vis-à-vis des agglutinines O a été vérifié par nos soins. Il convient de noter cependant que l'hydrolyse chlorhydrique nécessaire pour libérer les lipides, altère quelque peu le polyoside, ainsi le tyvélose qui entre dans sa constitution se trouve détruit.

A un volume du sérum à éprouver, on ajoute un volume de la solution de haptène dans du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2 (1 mg de polyoside par millilitre) et on incube quinze minutes à 37° C. Parallèlement, on titre le sérum dilué au demi dans le même tampon en l'absence de haptène. On vérifie que le pouvoir agglutinant des sérums éprouvés a bien été inhibé par l'addition de polyoside.

Cette expérience réalisée sur quatre sérums doués d'une forte activité lytique et dont le titre en agglutinines O variait entre 1/16 et 1/40 (sérums prélevés douze jours après la deuxième injection vaccinnante), a montré que l'activité lytique n'était nullement modifiée par la présence du polyoside bactérien.

Dans une expérience inverse, nous avons examiné quelle pouvait être l'influence de l'addition d'anticorps dans les sérums doués de

forte activité lytique. Le protocole suivi fut identique au précédent, la solution de haptène étant remplacée par une dilution, soit de sérums humains, prélevés chez des convalescents de typhoïde, chauffés trente minute à 56° C de façon à inactiver leur pouvoir lytique propre, soit de sérum expérimental de lapin également chauffé, en faisant varier la quantité d'anticorps introduite.

On n'a observé aucune influence des anticorps somatiques ou flagellaires sur l'activité lytique.

L'influence éventuelle jouée par les anticorps Vi a été également vérifiée à l'aide d'une technique analogue effectuée en utilisant des sérums expérimentaux obtenus chez le lapin par injection de *Salmonella ballerup*, de titre égal ou supérieur à 1/20 000. L'addition d'anticorps Vi ne modifie en rien l'activité lytique.

b) *Influence de l'addition du facteur F1 ou du facteur F2 sur l'activité lytique.* — Afin de vérifier la seconde hypothèse, celle d'un développement excessif de l'un des facteurs de l'obsistine par rapport à l'autre, nous avons préparé, comme nous l'avons indiqué précédemment, les deux fractions F1 et F2 et nous avons cherché à vérifier si l'addition en quantité progressive de l'un ou l'autre de ces facteurs influencerait l'activité lytique.

Le protocole expérimental que nous avons suivi est très voisin de celui qui nous a permis d'étudier l'effet de l'addition de polyoside ou d'anticorps. On introduit dans le milieu réactionnel des quantités variables de fraction F1 ou bien de fraction F2 et on compare l'activité lytique finale observée, à celle d'un même système dans lequel la fraction F1 ou F2 a été préalablement inactivée par chauffage à 56° C pendant trente minutes.

Les figures 11, 12, 13 et 14 illustrent les résultats observés. L'influence de l'addition de F1 est négligeable ; en revanche, si sur les sérums de faible activité, l'addition de F2 est également négligeable, il n'en est plus de même sur les sérums de forte activité lytique. On sait, comme nous l'avons précédemment indiqué, que dans ce dernier cas, les points expérimentaux ne se situent pas tous habituellement sur un même segment de droite, mais que tout se passe comme si la lyse ne commençait que lorsqu'une quantité de sérum suffisante a été

FIGURE 11

Effet de l'addition de F1 et de F2 à un sérum A (prélevés 24 heures avant la première injection.)

+ Témoin sans addition, ni de F1, ni de F2.

● Témoin en présence de F1.

○ Témoin en présence de F2.

En abscisses, les volumes de sérum à éprouver introduits dans le milieu réactionnel exprimés en millilitres. En ordonnées, la densité optique du milieu réactionnel exprimée en unités conventionnelles.

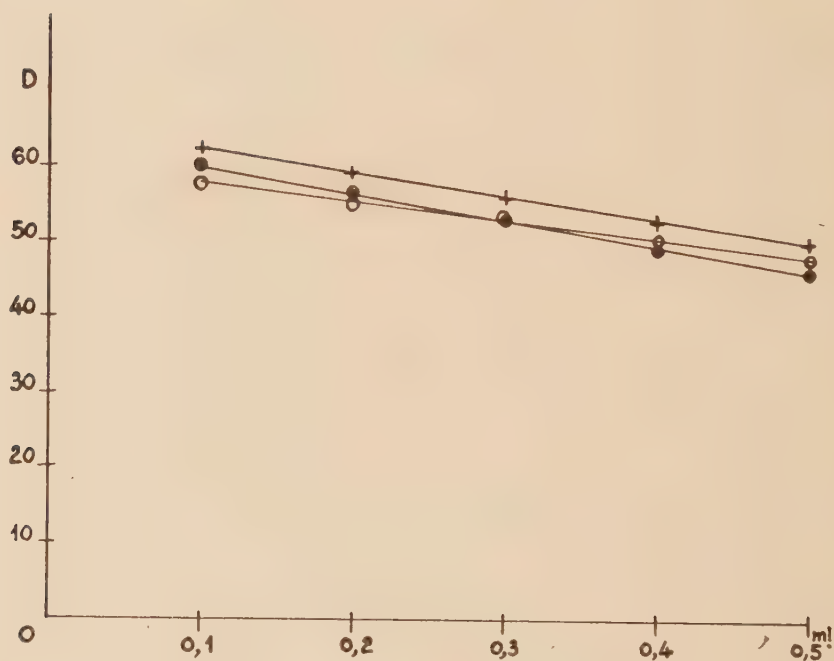


FIGURE 12

Effet de l'addition de F1 et de F2 à un sérum B (prélevé 12 jours après la première injection vaccinale). Mêmes conventions que pour la figure 11.

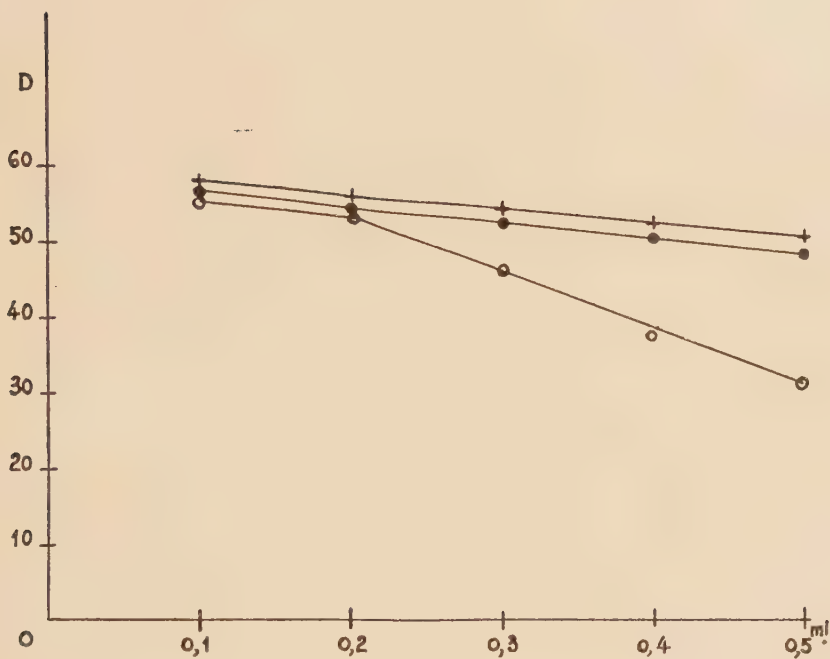


FIGURE 13

Effet de l'addition de F1 et de F2 à un sérum C (prélevé 12 jours après la seconde injection vaccinale). Mêmes conventions que pour la figure 11.

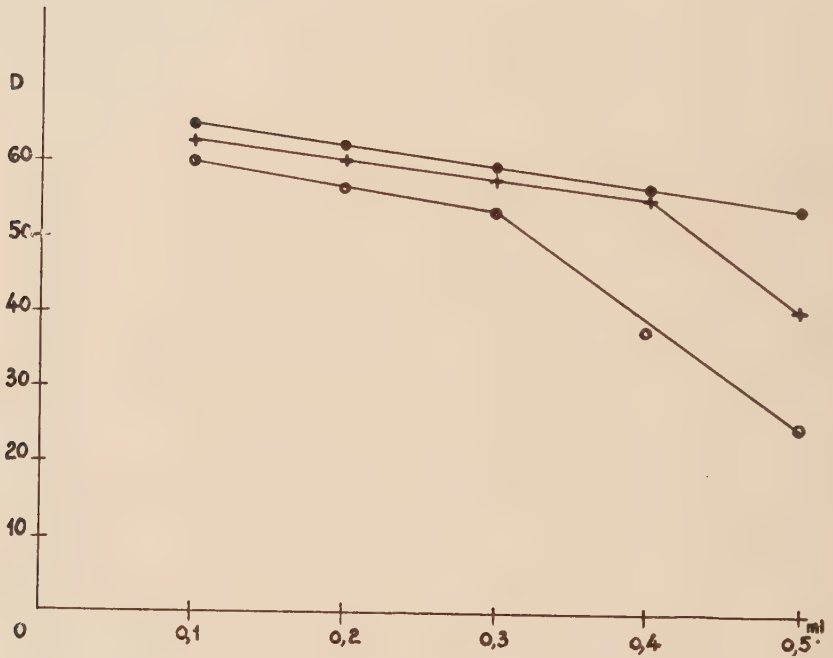
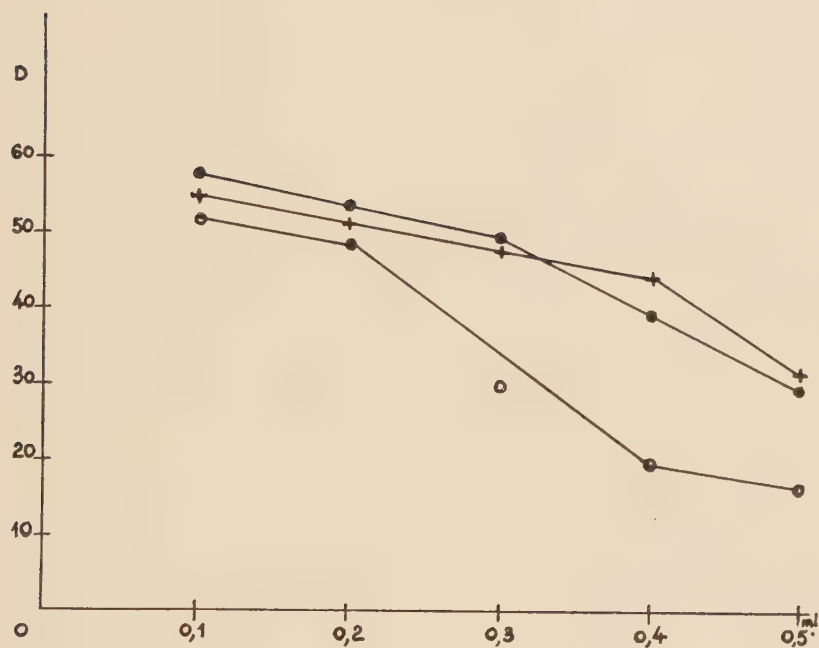


FIGURE 14

Effet de l'addition de F1 et de F2 à un sérum D (prélevé 12 jours après la troisième injection vaccinale). Mêmes conventions que pour la figure 11.



introduite dans le milieu réactionnel *. L'addition de F2 a généralement pour effet de décaler vers des valeurs plus faibles la quantité de sérum nécessaire pour que la lyse maximale s'observe. Ceci est illustré notamment par la figure 14 où l'on constate que celle-ci se manifeste pour 0,2 ml de sérum en présence de F2, alors qu'elle ne commençait à se manifester que pour 0,3 ml de sérum en absence de F2. Cet effet est d'autant plus marqué que la quantité de F2 ajoutée est plus grande, et très généralement, on observe que l'effet maximal est atteint lorsque le volume de la fraction F2 introduit dans le milieu réactionnel est sensiblement égal au volume du sérum étudié.

Inversement, l'addition de F1 au lieu de manifester un effet correcteur comme celui que nous venons de décrire pour la fraction F2, accentue encore le déséquilibre humoral, d'une part en limitant davantage encore la zone de concentration de sérum dans laquelle la lyse peut être obtenue, et d'autre part en diminuant l'intensité de la lyse maximale ; ce phénomène est d'autant plus marqué que la quantité de F1 ajoutée est plus grande, et dans de nombreux cas, on peut par ce moyen inhiber complètement la lyse bactérienne.

Des observations précédentes, on peut conclure que la vaccination a eu pour effet d'augmenter à la fois le titre des facteurs F1 et F2 dans le sérum des vaccinés, mais que F1 a augmenté de façon excessive par rapport à F2, si bien que les proportions nécessaires pour observer une lyse maximale ne sont plus réalisées. L'addition de F2 permet de corriger le déséquilibre et l'intensité de la lyse dépasse alors celle qui était primitivement observée.

* Des travaux très récents poursuivis par M. CAMENSULI à la Division de Microbiologie du C.R.S.S.A. ont permis d'interpréter ces observations. En réalité la courbe représentant la variation du nombre de bactéries détruites en fonction de la concentration du sérum, est une sigmoïde. Lorsque l'activité lytique est très faible, cette sigmoïde est très aplatie et peut être confondue avec une droite. En revanche, dans les sérums de forte activité, la forme en « S » est extrêmement marquée et la courbe peut être grossièrement interprétée comme constituée de trois éléments linéaires. La pente du segment moyen est évidemment le seul significatif pour permettre d'apprécier l'intensité de l'activité lytique.

III. — *VÉRIFICATION QUE LES INHIBITIONS DE L'ACTIVITÉ LYTIQUE OBSERVÉE CHEZ CERTAINS SUJETS, AU COURS DE LA VACCINATION, SONT BIEN DUES A UN DÉSÉQUILIBRE ENTRE LES FRACTIONS F1 ET F2.*

Il nous est apparu utile de vérifier sur un nombre plus élevé de sujets la généralité des conclusions précédentes, et de suivre l'effet de l'addition des fractions F1 et F2 pendant toute la durée de la vaccination. Puisque, comme nous l'avons indiqué, la correction maximale est en général atteinte quand on introduit dans le milieu réactionnel un volume de fraction F2 égal au volume du sérum, c'est dans ces conditions que nous nous sommes placés. Nous avons donc comparé l'activité lytique finale observée après introduction successive de l'une ou l'autre fraction à celle d'un même système dans lequel ces deux fractions n'étaient pas incorporées. Cette étude menée sur vingt-quatre sujets nous permet d'une part de confirmer ces conclusions, et d'autre part, d'interpréter l'effet paradoxal, fréquemment observé après la deuxième ou troisième injection vaccinale, dans lequel l'activité lytique, jusque là marquée, s'écroule brusquement.

L'addition soit de F1 soit de F2 dans les sérums prélevés la veille de la première injection vaccinale n'a qu'un effet négligeable sur l'activité lytique qui, d'une manière générale, est d'un niveau très faible. La figure 11 illustre une observation de ce type. En revanche, dans 40 p. 100 des cas, tantôt l'addition de la fraction F1, tantôt l'addition de la fraction F2, semblent accentuer légèrement la lyse, alors que l'addition de la fraction complémentaire n'est suivie d'aucun effet.

Après la première injection vaccinale, on observe qu'il n'y a plus que 40 p. 100 de sérums pour lesquels l'addition de l'une ou l'autre fraction demeure sans effet appréciable. En revanche, pour les sérums restants, soit dans 40 p. 100 des cas, l'addition de la fraction F2 augmente nettement la lyse alors que l'addition de F1 demeure sans effet (fig. 12).

La seconde injection vaccinale a pour effet d'augmenter encore le pourcentage des sérums (70 p. 100) dont l'activité lytique est accentuée par l'introduction de la fraction F2, la fraction F1 demeurant sans effet.

Au terme de la vaccination, vingt-trois sérums sur les vingt-quatre étudiés ont leur activité lytique fortement augmentée par l'addition de F2. Il convient de noter que l'unique sérum demeuré indifférent possédait un titre d'obsistine très faible. Pour les sérums dont le titre d'obsistine dépasse 100 unités, l'addition de la fraction F1 inhibe la lyse quelle que soit la quantité de sérum ajoutée. Ce phénomène est illustré par la figure 13.

En somme, chez les sujets étudiés, le titre d'activité lytique est très faible avant la vaccination ; puisque l'addition des fractions F1 et F2 ne provoque aucune modification, on peut en conclure qu'il s'agit là non pas d'une inhibition par excès de l'un ou l'autre facteur du système, mais bien d'un taux très faible à la fois des facteurs F1 et F2.

La vaccination a eu pour effet de provoquer une augmentation à la fois des titres de F1 et F2 et l'activité lytique atteint ainsi son maximum tant que les proportions relatives des différents facteurs demeurent convenables.

Dans un nombre élevé de cas, tout se passe comme si la répétition des injections provoquait un déséquilibre dû au développement excessif de la fraction F1 ; dans ce cas, l'activité lytique maximale est fortement diminuée, mais peut être corrigée par addition de quantité convenable de la fraction F2.

IV. — *EFFET DE L'INJECTION DE RAPPEL.*

Il ne nous a pas été possible de suivre chez les mêmes sujets les variations du titre d'obsistine pendant l'année qui a suivi les vaccinations. Pour nous rendre compte des effets lointains, et pour évaluer l'influence de l'injection de rappel, nous avons dû nous rapporter à un lot de trente-cinq sujets différents qui avaient été vaccinés l'année précédente dans des conditions rigoureusement identiques à celles des lots de sujets précédemment étudiés.

Chez ces trente-cinq sujets, on a titré l'obsistine, d'une part la veille de l'injection de rappel et, d'autre part, douze jours après cette injection (respectivement sérums G et H). Les résultats sont présentés dans le tableau II.

L'examen de détail fait apparaître que l'injection de rappel provoque une baisse du taux de l'obsistine chez 80 p. 100 des sujets.

TABLEAU II

Variations du titre de l'obsistine chez 35 sujets ayant reçu l'injection de rappel DT.TAB.

Sérum G : 1 an après la première vaccination et la veille de l'injection de rappel.

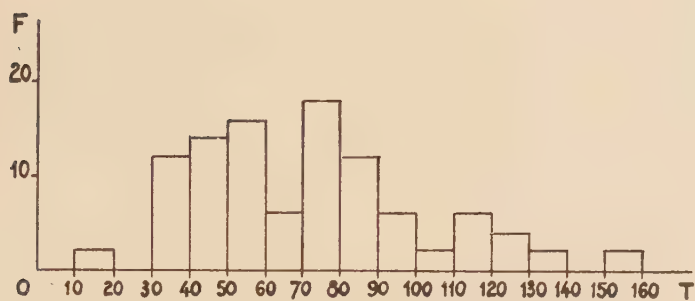
Sérum H : 12 jours après l'injection de rappel.

	Date des prélèvements de sérum	
	G	H
N° d'ordre des sujets	1	130
	2	80
	3	85
	4	106
	5	72
	6	95
	7	60
	8	70
	9	125
	10	140
	11	120
	12	125
	13	90
	14	70
	15	173
	16	125
	17	126
	18	125
	19	160
	20	90
	21	126
	22	120
	23	85
	24	83
	25	46
	26	95
	27	56
	28	56
	29	82
	30	120
	31	100
	32	90
	33	105
	34	90
	35	17

Dans trois quarts des cas, cette diminution de l'activité lytique est très marquée et touche plus particulièrement les sujets qui au départ présentaient un titre d'obsistine très élevé. En revanche, les 20 p. 100 de sujets restants, présentent une montée très modérée de l'obsistine. Cet effet se retrouve au point de vue statistique à l'examen de l'histogramme correspondant au sérum H (fig. 9), où l'on retrouve un certain recul de la médiane. L'injection de rappel aurait donc pour effet d'entraîner une diminution très marquée de l'activité lytique, phénomène que l'on peut rapprocher de ce que l'on a observé à la suite de la troisième injection.

FIGURE 9

Histogramme correspondant aux sérums H prélevés douze jours après l'injection de rappel (35 sérums). Mêmes conventions que pour la figure 2.



DISCUSSION

Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas d'épreuve de laboratoire permettant d'estimer avec quelque certitude le degré de l'immunité obtenue par la vaccination contre les salmonelloses. On a certes observé que celle-ci provoque, tant chez l'homme que chez les animaux, l'apparition d'anticorps divers, en même temps qu'une immunité acquise se développe vis-à-vis d'une infection ultérieure naturelle ou expérimentale, mais si la corrélation est certaine, il semble bien que le second phénomène ne soit pas lié au premier par une relation directe de cause à effet. Colobert et Kirn (28) se sont demandés si le système lytique non spécifique que constitue l'obsistine ne jouerait pas un rôle dans l'immunité acquise par la vaccination. De fait, ces auteurs ont établi que l'obsistine participe de manière active — tout au moins chez le singe — à la réaction de l'organisme contre une tentative d'infection *per os*, d'une manière analogue, mais non parallèle aux anticorps agglutinants. Ils ont également montré que chez le singe, les injections de vaccin antityphoparatyphoïdique A et B suscitaient à la fois une élévation progressive et considérable du taux de l'obsistine, l'apparition d'anticorps spécifiques agglutinants à un titre faible et le développement d'un pouvoir de séroprotection vis-à-vis de l'infection expérimentale de la souris. Ces trois phénomènes sont manifestement en corrélation mais il n'existe aucun parallélisme entre eux. Ainsi la persistance des anticorps agglutinants paraît bien plus durable que celle du pouvoir de séroprotection qui disparaît en un mois et demi et que celle de l'obsistine qui se retrouve au titre initial trois mois et demi environ après la troisième injection.

Un autre argument en faveur du rôle éventuel de l'obsistine dans l'immunité acquise tient au fait que, comme l'ont encore montré Colobert et Kirn (77), l'antigène Vi protège le bacille d'Eberth contre la lyse par l'obsistine. Cette constatation semble éclairer d'un

jour nouveau la pathogénie de la fièvre typhoïde. On avait remarqué depuis longtemps que dans cette maladie, la durée considérable de la phase d'invasion, le petit nombre de bactéries en circulation dans le sang, la guérison spontanée fréquente témoignaient d'un certain degré de résistance naturelle. La résistance à la lyse des bactéries pourvues de l'antigène Vi permet d'interpréter le rôle de cet antigène en tant que facteur de virulence.

Nous avons entrepris de vérifier, si, chez l'homme, la pratique actuelle de la vaccination réglementaire dans l'armée par le vaccin DT.TAB provoque bien, comme l'ont constaté Colobert et Kirn chez le singe, une augmentation de l'activité lytique du sérum. L'observation de cinquante-deux sujets choisis pour ne jamais avoir reçu de vaccination antityphoparatyphoïdique montre qu'effectivement, la première injection augmente de façon marquée le titre de l'obsistine. En revanche, la deuxième injection ou la troisième pratiquées à quinze jours d'intervalle, entraînent des perturbations inattendues et variables suivant les sujets. On observe en effet, dans un nombre élevé de cas, un brusque écroulement du titre de l'activité lytique qui peut même atteindre un niveau inférieur à celui du taux de départ. L'examen des histogrammes fait apparaître de manière particulièrement nette, que la dispersion des fréquences des titres atteints par l'obsistine est très ramassée dans les sérums des sujets avant la vaccination et dans celui des sujets six mois après la dernière injection. En particulier, à cette dernière date, la médiane se situe entre 50 et 60 unités d'obsistine, alors qu'elle est seulement de l'ordre de 20 unités dans le cas des sérums prélevés avant la vaccination. En revanche, dans toute la période intermédiaire, on observe un étalement des courbes de fréquence, sans médiane nette, ce qui semble bien traduire l'existence d'une perturbation humorale qui ne trouve finalement son expression dans le sens d'une augmentation de l'activité lytique, que tardivement. En effet, six mois après la troisième injection, le titre de l'obsistine demeure encore bas, mais il se relève par la suite, et un an après la troisième injection, il est très nettement supérieur à celui de départ. L'injection de rappel pratiquée à ce moment ne provoque pas l'effet attendu, sauf chez certains sujets qui représentent une minorité. Dans la majorité des cas, le titrage pratiqué douze jours après l'injection témoigne d'un net recul de l'activité lytique.

Si ces observations prouvent l'existence d'une relation entre l'injection du vaccin et le titre de l'obsistine, on n'y retrouve pas la

régularité observée précédemment chez le singe par Colobert et Kirn. Nous avons pensé que ceci pouvait éventuellement provenir de l'augmentation dans le sérum du titre de substances inhibitrices ou interférant avec l'obsistine. Nous avons écarté cette hypothèse, tout au moins l'éventualité d'une action des agglutinines. Nous avons alors cherché à vérifier l'hypothèse que la baisse de l'activité observée pourrait être due à un déséquilibre humoral, tenant au fait que l'obsistine n'est pas une substance unique, mais représente un système d'au moins deux facteurs protéiniques, comme l'ont montré Colobert et Kirn (45). Colobert et Feitz * sont arrivés, en fractionnant le sérum sanguin par précipitation par les phosphates, à obtenir des préparations de ces deux facteurs ; chacun d'eux, isolément, ne témoigne d'aucune activité lytique, alors que leur mélange restitue complètement celle-ci. On pouvait donc penser que les injections de vaccin aient eu pour effet, au moins chez un certain nombre de sujets, de provoquer une augmentation plus marquée de l'un de ces facteurs par rapport à l'autre, si bien que les proportions relatives optimales, nécessaires pour que l'activité lytique se manifeste intensément, ne se trouveraient plus respectées, l'équilibre harmonieux de leur concentration relative se réalisant cependant finalement peu à peu.

Nous avons donc tenté de corriger un déséquilibre éventuel par l'addition aux sérums étudiés, successivement de chacun des deux constituants inactifs, préalablement isolés à partir d'un mélange de sérums. On a trouvé que l'addition de l'une des fractions, désignée jusqu'ici simplement par le symbole F1 n'augmente que très peu, ou pas du tout, l'activité lytique du sérum auquel elle est ajoutée. En revanche, l'addition de F2, spécialement dans le sérum de sujets qui ont présenté un brusque écroulement de l'activité lytique à la suite de la deuxième injection vaccinale, ou plus souvent de la troisième, restaure une activité lytique habituellement très intense et corrige les anomalies cinétiques de la lyse. Il semble donc que l'hypothèse de départ puisse être retenue.

Ces observations semblent riches d'applications pratiques, s'il est vrai que l'obsistine représente un des facteurs essentiels de l'immunité acquise. Il est en effet manifeste, que dans ces conditions, la technique actuelle de vaccination est incorrecte. Ceci pourrait tenir au fait que l'intervalle de temps (quinze jours) entre les injections vaccinales est

* Communication personnelle non publiée.

trop court ou bien que la dose de vaccin est trop élevée. Ces conclusions peuvent être mises en parallèle avec les résultats de l'étude des cas de typhoïde survenus chez les vaccinés.

On sait que la fièvre typhoïde peut récidiver chez 1 à 2 % des individus ; de même, la vaccination préventive ne peut assurer une immunité définitive. En effet, certains sujets correctement vaccinés depuis peu peuvent présenter une affection typhoparatyphoïdique bactériologiquement confirmée. Par exemple, en 1960, d'après Bernard, Bonnet, Calvet et Laverdant (7), on notait un accroissement du nombre de cas de fièvres typhoparatyphoïdiques en milieu militaire, où en principe tout le personnel est vacciné, puisqu'en 1959 ces auteurs avaient dénombré 465 cas contre 742 pendant les deux années précédentes. On rapporte habituellement cette défaillance de la vaccination préventive à plusieurs facteurs dont le défaut de composition du vaccin actuellement employé, son mode de préparation, son mode d'administration, le rôle éventuel des associations vaccinales. L'existence d'une « phase négative » a été parfois soulevée par certains auteurs. Ainsi, en 1959, Bernard et Jau-neau (6) notent dans leur rapport qu'« un fait assez curieux » est la recrudescence des typhoïdes, notée dans le premier mois qui suit la vaccination, et également qu'« il est curieux de voir que les sujets ayant reçu deux rappels à des intervalles de quinze jours à six mois (au début de la deuxième année qui suit la série des quatre injections de primovaccination), ne présentent de typhoïde que dans les deux premiers trimestres suivant cette injection ». Plus récemment encore, au cours d'une enquête réalisée en Roumanie, Nestoresco a noté que l'apparition de cas de fièvre typhoïde dans les groupes de vaccinés est d'autant plus élevée que la vaccination était plus récente (64). Il est remarquable que cette « phase négative », qui apparaît à la fin de la vaccination ou à la suite de l'injection de rappel, coïncide avec la période où le titre de l'obsistine baisse provisoirement.

Ainsi, les résultats observés chez l'homme sont comparables à ceux déjà observés chez le singe par Colobert et Kirn. Il resterait à préciser par une expérience directe permettant de mettre en évidence le degré de corrélation entre la résistance vis-à-vis de l'infection et le taux de l'obsistine, la part réelle jouée par ce système dans l'immunité antibactérienne acquise. Les difficultés expérimentales de reproduire chez l'animal une affection analogue aux fièvres typhoïde et paratyphoïdes humaines rend la solution de ce problème très difficile. Il ne sera probablement résolu une fois encore que par le moyen de vastes enquêtes réalisées sur l'homme.

CONCLUSIONS

Une propriété lytique nouvelle du sérum humain dit normal a été individualisée sous le nom d'*obsistine* par Colobert et Kirn. L'*obsistine* représenterait un système complexe comportant plusieurs facteurs de nature protéinique individuellement inactifs, mais dont l'action conjuguée entraînerait, en particulier, la lyse des salmonelles.

Si l'étude de la variation du taux de l'*obsistine* avait été faite antérieurement au cours de l'infection expérimentale du singe, et également chez l'homme au cours d'une expérimentation limitée, celle des fractions F1 et F2 n'aurait pas encore été entreprise.

Nous avons procédé à l'étude de la variation du taux de l'*obsistine* et du comportement de ses deux fractions au cours et au décours de la vaccination associée antidiphthérique-antitétanique-antityphoparatyphoïdique chez 52 sujets.

Il nous est apparu essentiellement que contrairement à ce qui a été observé jusqu'ici chez l'animal, la répétition des injections au cours de la vaccination provoque chez un nombre élevé de sujets une chute marquée du taux de l'*obsistine*.

Que cette chute du taux de l'*obsistine* doit être rapportée à un déséquilibre dans les proportions relatives des divers facteurs humoraux entrant en jeu dans le système complexe de l'*obsistine*. La correction de ce déséquilibre par addition de fractions protéiniques du sérum, correspondant à certains de ces facteurs seulement, restaure une puissante activité lytique très supérieure à celle existant avant la vaccination.

Que ce déséquilibre provoqué par des injections, peut-être trop rapprochées, se corrige spontanément peu à peu et le titre d'*obsistine* des sérums des vaccinés un an après les trois premières injections vaccinales, pratiquées à quinze jours d'intervalle, est beaucoup plus élevé que chez des sujets n'ayant jamais été vaccinés.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALEXA (E.) et MANOLIU (E.). *C.R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 891.
- (2) ALEXA (E.) et MANOLIU (E.). *C.R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 895.
- (3) AMANO (T.), INAI (S.), SEKI (Y.), KASHIBA (S.), FUJIKAWA (K.) and NISHIMURA (S.). *Med. J. Osaka Univ.*, 1954, **4**, 401.
- (4) AMANO (T.), SEKI (Y.), FUJIKAWA (K.), KASHIBA (S.), MORIOKA and ICHIKAWA (S.). *Med. J. Osaka Univ.*, 1956, **7**, 245.
- (5) AYCOCK (C.). *J. prevent. Med.*, 1929, **3**, 245.
- (6) BERNARD (J.G.) et JAUNEAU (A.). *Rev. Immunol.*, 1959, **23**, 273.
- (7) BERNARD (J.G.), BONNET (P.), CALVET (G.) et LAVERDANT (C.). *Bull. Mem. Soc. Med. Hôp. Paris*, 1960, **76**, 1185.
- (8) BERNARD (J.G.), COLOBERT (L.), DARBON (A.), DIOUX (R.), DOUKAN (G.), GIRIER (L.), MONTAGNON (B.) et SERVANT (P.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1962, **26**, 699.
- (9) BOIVIN (A.) et RICHOU (R.). *C.R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1130.
- (10) BOIVIN (A.). *Rev. Immunol.*, 1940, **6**, 273.
- (11) BONNEFOI (A.) et GRABAR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 719.
- (12) BONNEFOI (A.) et GRABAR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 259.
- (13) BONNEFOI (A.) et GRABAR (J.). *Bull. Acad. Méd.*, 1949, **133**, 172.
- (14) BORDET (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1895, **9**, 462.
- (15) BRENNER (S.), DAAK (F.A.), GERHARDT (P.), JEYNES (H.H.), KANDLER (O.), KELLENBERGER-NOBEL (E.), MAC QUILLEN (K.), RIBIO-HUESTOS (M.), SALTON (M.R.J.), STRANGE (R.E.), TOMC-SIK (J.) and WEIBULL (C.). *Nature*, 1958, **181**, 1713.
- (16) BRISOU (J.) et BRANGIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **78**, 793.
- (17) BUCHNER (H.). *München Med. Wehnschr.*, 1889, **36**, 22.
- (18) BUCHNER (H.). *München Med. Wehnschr.*, 1891, **8**, 439.
- (19) BURGI (E.). *Arch. Hyg.*, 1907, **62**, 239.
- (20) CHALIER (J.) et LEDRU (J.). *J. Méd. Lyon*, 1939, **20**, 9.
- (21) CIUCA (M.). *Arch. Roum. Path. exp. Microbiol.*, 1931, **4**, 216.
- (22) COCKBURN (W.C.). *Bull. O g. mond. Santé*, 1955, **13**, 395.
- (23) COLOBERT (L.) et LENOIR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 74.
- (24) COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *C.R. Soc. Biol.*, 1960, **154**, 600.
- (25) COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 69.
- (26) COLOBERT (L.). Lysozyme et autarcèse. *Path. et Biol.*, 1960, **8**, 1023.
- (27) COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 159.
- (28) COLOBERT (L.) et KIRN (A.), SERVANT (P.) et MONTAGNON (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 600.

- (29) COLOBERT (L.), KIRN (A.), MONTAGNON (B.) et SERVANT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 613.
- (30) COLOBERT (L.) et CREACH (O.). La paroi ectoplasmique des bactéries. *Path. et Biol.*, 1961, **9**, 361.
- (31) CORVAZIER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 173.
- (32) CREACH (O.) *Thèse, Pharm. Univ. Lyon*, 1960 n° 479.
- (33) DUMAS (J.). Les Animaux de Laboratoire. *Collections Institut Pasteur*. Flammarion édit., Paris 1953.
- (34) DURAND (P.). *Rev. Immunol.*, 1947, **297**, 11.
- (35) EDSALL (G.), CARLSON (M.C.), FORMAL (S.B.) and BENENSON (A.S.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1959, **20**, 1017.
- (36) EICHENBERGER (E.) et SCHMIDT (G.). *Experientia* (Bâle), 1958, **14**, 289.
- (37) FELIX (A.) and PITT (R.M.). *Lancet*, 1934, **2**, 186.
- (38) FLEMING (A.). *Proc. Roy. Soc. B.*, 1922, **93**, 306.
- (39) FLEMING (A.) and ALLISON (W.D.). *Brit. J. Exp. Path.*, 1922, **3**, 250.
- (40) FRICKER (J.) et FERRABOUC (L.). *Pr. Méd.*, 1932, **44**, 873.
- (41) GIBSON (H.J.). *J. Hyg.*, 1930, **30**, 337.
- (42) GRABAR (Mme J.) et BONNEFOI (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 745.
- (43) GRABAR (Mme J.) et LE MINOR (Mme S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 529.
- (44) GRABAR (Mme J.) et LE MINOR (Mme S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 239.
- (45) GRABAR (Mme J.) et LE MINOR (Mme S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 601.
- (46) GRABAR (Mme J.) et LE MINOR (Mme S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 117.
- (47) GRINNEL (F.B.). *J. Exptl. Méd.*, 1932, **56**, 907.
- (48) HEGEMAN (F.). *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk.*, 1957, **170**, 71.
- (49) JUDE (A.). *Rev. Immunol.*, 1947, **11**, 40.
- (50) JUDE (A.). *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 215.
- (51) JUDE (A.) et MASSE (A.). *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 20.
- (52) KASANOV (M.), KHEIFETS (L. B.) et SALMIN (U.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1962, **26**, 371.
- (53) LANDY (M.) and LAMB (B.). *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1953, **82**, 593.
- (54) LANDY (M.), GAINES (H.) and SPRINZ (H.). *Brit. J. Exptl. Path.*, 1957, **38**, 24.
- (55) LE MINOR (L.), LE MINOR (S.) et GRABAR (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 62.
- (56) LEPOW (I.H.), PILLÈMER (L.) and RATNOFF (O.D.). *J. Exptl. Méd.*, 1956, **130**, 553.
- (57) LIGER (H.). *Arch. Méd. Pharm. Milit.*, 1934, **101**, 98.
- (58) MACKIE (T.J.) and FINKELSTEIN (M.H.). *J. Hyg.*, 1932, **32**, 1.
- (59) MEIR (R.) et SCHAR (B.). *Arch. exp. Path. Pharmacol.*, 1958, **234**, 102.
- (60) MELNOTTE (P.), JAULMES (Ch.), BOLZINGER (R.) et GIRIER (L.). *Rev. Immunol.*, 1948, **12**, 97.
- (61) MILLER (C.P.). *Sciences*, 1933, **78**, 340.
- (62) MUSCHEL (L.H.), CAREY (W.F.) and BARON (L.S.). *J. Immunol.*, 1959, **82**, 38.
- (63) NANNI (G.). *Experientia* (Bâle), 1958, **14**, 23.
- (64) NESTORESICO (N.). *Arch. Roum. Path. exper. Microbiol.*, 1961, **20**, 321.
- (65) NICOLESCO (M.). *Arch. Roum. Path. exper. Microbiol.*, 1961, **20**, 523.
- (66) NUNGESTER (W.J.), WOLF (A.A.) and JOURDONNAIS (L.F.). *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1932, **30**, 120.

- (67) NUTTALL (G.). *Ztschr. f. Hyg. Leipzig*, 1888, **4**, 353.
- (68) ORSKOW (F.). *Z. Immunitätsf.*, 1940, **89**, 359.
- (69) PERRY (H.), FINDLAL (H.T.) and BENSTED (H.S.). *J. Roy. Army Med. Corps*, 1933, **9**, 241.
- (70) PERRY (H.), FINDLAL (H.T.) and BENSTED (H.S.). *J. Roy. Army Med. Corps*, 1934, **62**, 161.
- (71) PFEIFFER (R.) and ISSAEFF (Z.). *J. Hyg.*, 1894, **17**, 355.
- (72) PILLEMER (L.), BLUM (L.), LEPOW (I.H.), ROSS (O.H.), TODD (E.W.) and WARDLAW (A.C.). *Sciences*, 1954, **120**, 279.
- (73) PILLEMER (L.). *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1955, **17**, 526.
- (74) RAKE (G.). *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1935, **32**, 1523.
- (75) RASKA (K.), MATEJOVSKA (D.) et JELINEK (J.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1962, **26**, 381.
- (76) ROSEN (F.S.), SKARNES (R.C.), SHEAR (M.J.) and LANDY (M.). *J. Exp. Med.*, 1958, **108**, 701.
- (77) SALTON (M.R.J.). *Nature*. 1952, **170**, 746.
- (78) SILER (J.F.). *Amer. J. publ. Hlth.*, 1937, **27**, 142.
- (79) SKARNES (R.C.) and WATSON (D.W.). *Bact. Rev.*, 1957, **21**, 273.
- (80) SKARNES (R.C.), ROSEN (R.S.), MURRAY (M.D.), SHEAR (M.J.) and LANDY (M.). *J. exp. Méd.*, 1958, **108**, 685.
- (81) SPECTOR (W.G.). *J. Path. Bact.*, 1951, **63**, 93.
- (82) STANDFAST (A.F.B.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1960, **23**, 37.
- (83) STANDFAST (A.F.B.). *Bull. Org. mond. Santé*, 1960, **23**, 47.
- (84) THIBAUT (P.). *Concours Méd.*, 1960, **82**, 6193.
- (86) UNGAR (G.). *Rev. Canad. Biol.*, 1953, **12**, 253.
- (85) TIMMERMAN (W.A.). *Brit. J. exp. Path.*, 1930, **11**, 447.
- (87) VINCENT (H.). *Bull. Acad. Méd.*, 1921, **85**, 123.
- (88) VINCENT (H.). *Bull. Acad. Méd.*, 1942, **126**, 504.
- (89) WARDLAW (A.C.) and PILLEMER (L.). *J. Exp. Méd.*, 1956, **130**, 553.
- (90) WEDGWOOD (R.J.). *Résumés VIII^e Congrès Intern. Microb.*, Stockholm, 1958, 190.
- (91) WEIL (A.J.) and GALL (L.S.). *J. Immunol.*, 1941, **445**, 41.
- (92) WESTPHAL (O.). *Angew. Chem.*, 1952, **64**, 314.
- (93) WESTPHAL (O.), NOWOTNY (A.), LUDERITZ (O.), HURNI (H.), EICHENBERGER (E.), and SCHONHOLZER (G.). *Pharm. acta Helv.*, 1958, **33**, 401.
- (94) YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION. *Bull. Org. mond. Santé*, 1957, **16**, 897.
- (95) YUGOSLAV TYPHOID COMMISSION. *Bull. Org. mond. Santé*, 1962, **26**, 357.
-

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	15
---------------------------	----

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I. — <i>Contrôle de l'efficacité de la vaccination TAB</i>	17
I — Epreuves <i>in vitro</i>	18
a) Recherche des agglutinines spécifiques	18
II — Epreuves <i>in vivo</i>	20
a) L'épreuve de séro-protection sur la souris	20
b) L'épreuve de séro-protection sur embryon de poulet ..	22
III — Epreuves épidémiologiques	23
CHAPITRE II. — <i>Facteurs antimicrobiens des tissus et des humeurs, actifs sur les bactéries à Gram négatif</i>	27
I — L'alexine	27
II — Le complément	28
III — Les anticorps normaux	30
IV — Le lysozyme	31
V — Synergie fonctionnelle du lysozyme et du système anticorps-complément	31
VI — La properdine	32
VII — Le facteur détoxifiant du sérum	32
VIII — Le facteur bactéricide de Wedgwood	33
IX — Facteurs antimicrobiens d'origine cellulaire	33
X — Rôle des substances antimicrobiennes dans la résistance naturelle	34
CHAPITRE III. — <i>L'obsistine</i>	37

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE IV. — <i>Méthodes expérimentales</i>	41
I — Caractéristiques du vaccin utilisé	41
II — Pratique des vaccinations	42
III — Préparation des deux fractions F1 et F2	43
IV — Dosage de l'obsistine	44
a) Préparation de la suspension bactérienne	47
b) Mise en évidence de l'effet des fractions F1 et F2 sur l'activité lytique	47
CHAPITRE V. — <i>Résultats expérimentaux</i>	49
I — Variations du titre de l'obsistine au cours de la vaccination... ..	49
II — Développement des différents facteurs entrant dans la composition de l'obsistine au cours de la vaccination	54
a) Influence des anticorps sur l'activité lytique	56
b) Influence de l'addition du facteur F1 ou du facteur F2 sur l'activité lytique	57
III — Vérification que les inhibiteurs de l'activité lytique observée chez certains sujets, au cours de la vaccination, sont bien dus à un déséquilibre entre les facteurs F1 et F2	63
IV — Effet de l'injection de rappel	64
<i>Discussion</i>	69
<i>Conclusions</i>	73
<i>Bibliographie</i>	76

